

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. September 2005 (29.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/090394 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07K 14/21**,  
C12P 13/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002689

(22) Internationales Anmeldedatum:  
14. März 2005 (14.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 013 847.8 20. März 2004 (20.03.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **DEGUSSA AG** [DE/DE]; Bennigsenplatz 1, 40474  
Düsseldorf (DE).

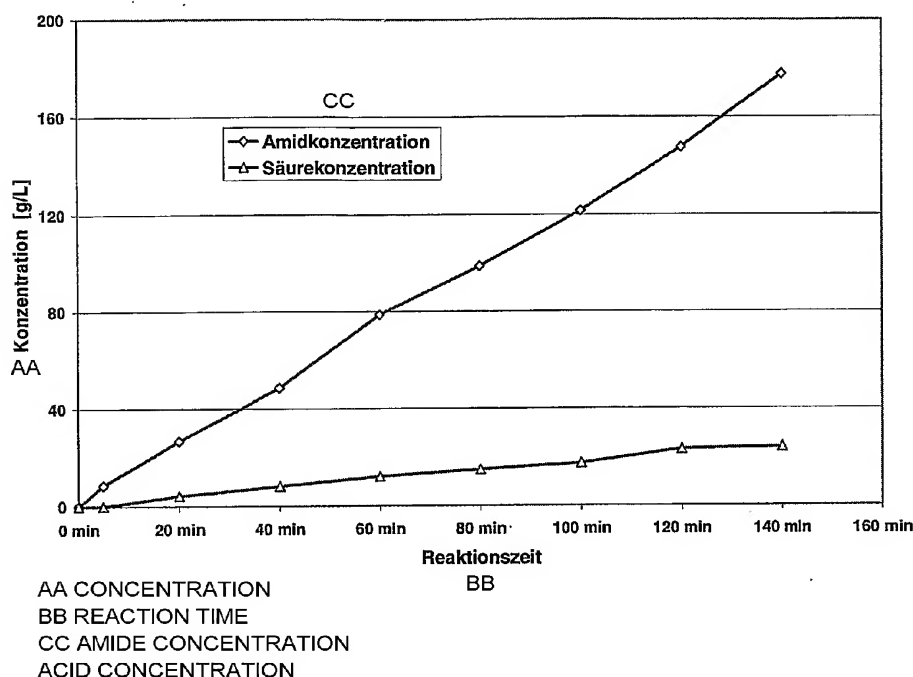
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **OSSWALD, Steffen** [DE/DE]; Landwehrstrasse 33, 63517 Rodenbach (DE). **WECKBECKER, Christoph** [DE/DE]; August-Imhof-Strasse 25, 63584 Gründau (DE). **HUTH-MACHER, Klaus** [DE/DE]; Lärchenweg 18, 63571 Gelnhausen (DE). **GERASIMOVA, Tatijana** [RU/RU]; Podolskih Kursantov, 18/1, fl. 626, Moscow, 117545 (RU). **NOVIKOV, Andrey** [RU/RU]; Kransnopresnenskaya nab., 1/2, fl. 107, Moscow, 123610 (RU). **RYABCHENKO, Ludmila** [RU/RU]; Moscow region, Mozajskoe sh., 113, Odintcovo, 14311 (RU). **YANENKO, Alexander** [RU/RU]; Kutuzovsky pr., 33, fl. 135, Moscow, 12193 (RU). **EGOROVA, Ksenia** [RU/DE]; Beerentalweg 119, 21077 Hamburg (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CYANIDE TOLERANT NITRILHYDRATASES

(54) Bezeichnung: CYANIDTOLERANTE NITRILHYDRATASEN



(57) Abstract: The invention relates to cyanide tolerant nitrilhydratases produced from Pseudomonas genus microorganisms which exhibit a high cyanide tolerance. Said invention also relates to the use of said compounds for producing amides from nitriles in the presence of cyanides, polynucleotide sequences coding for said enzymes and said enzymes.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/090394 A2



(74) **Gemeinsamer Vertreter:** DEGUSSA AG; Intellectual Property Management, PATENTE und MARKEN, Standort Hanau, Postfach 13 45, 63403 Hanau (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

**Veröffentlicht:**

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft cyanidtolerante Nitrilhydratasen aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, die eine erhöhte Cyanidtoleranz aufweisen, ihre Verwendung zur Herstellung von Amiden aus Nitrilen in Gegenwart von Cyaniden und für diese Enzyme kodierende Polynukleotidsequenzen und diese Enzyme.

### Cyanidtolerante Nitrilhydratasen

Die Erfindung betrifft cyanidtolerante Nitrilhydratasen insbesondere aus *Pseudomonas putida*- oder *Pseudomonas marginalis*- Stämmen, die eine erhöhte Cyanidtoleranz aufweisen, ihre Verwendung zur Herstellung von Amiden aus Nitrilen in Gegenwart von Cyaniden und für dieses Enzym kodierende Polynukleotidsequenzen.

Die Umsetzung von  $\alpha$ -Hydroxynitrilen (Cyanhydrinen) und  $\alpha$ -Aminonitrilen zu den entsprechenden Amiden mittels Nitrilhydratasen eröffnet eine neue Synthesevariante zu  $\alpha$ -Hydroxysäuren und  $\alpha$ -Aminosäuren, da  $\alpha$ -Hydroxy- und  $\alpha$ -Aminoamide auf einfache Weise verseift werden können (Process and catalysts for the production of methionine. Ponceblanc, Herve; Rossi, Jean-Christophe; Laval, Philip; Gros, Georges. (Rhône-Poulenc Animal Nutrition SA, Fr.), (WO 2001060789). Alternativ können  $\alpha$ -Hydroxyamide auch mit Alkali- oder Erdalkalimetallhydroxiden zu den entsprechenden Salzen der Hydroxysäuren umgesetzt werden. Besonders bevorzugt ist hierbei die Umsetzung von 4-Methylthio- $\alpha$ -hydroxybutyramid (MHA-Amid) mit Calciumhydroxid, da Calcium-MHA direkt als alternative Produktform zu Methionin oder MHA als Futtermittelzusatz eingesetzt werden kann.

Allerdings zerfallen  $\alpha$ -Hydroxynitrile und  $\alpha$ -Aminonitrile leicht zu Aldehyden und Blausäure bzw. Aldehyden, Blausäure und Ammoniak. Die entstehende Blausäure ist ein starker Inhibitor für fast alle bekannten Nitrilhydratasen, mit Ausnahme der Nitrilhydratase aus *Rhodococcus equi* XL-1, die bei 20 mM Cyanid den bisher geringsten bekannten Aktivitätsverlust zeigt. (Production of amides from nitriles by *Rhodococcus equi* cells having a cyanide resistant-nitrile hydratase. Nagasawa, Tohru; Matsuyama, Akinobu. (Daicel Chemical Industries, Ltd., Japan), (EP 1 266 962 A).

Die geringe Produktivität von ca. 8 g Amid pro g Biotrockenmasse der Ruhezellen, die lange Reaktionszeit von 43 Stunden und die relativ geringe Produktkonzentration von 75 g/L führen zur Suche nach verbesserten Nitrilhydratasen.

- 5 Das Ziel der hier beschriebenen Erfindung ist deshalb einen Biokatalysator zur Verfügung zu stellen, der nicht diesen Einschränkungen unterliegt. Ausserdem ist eine noch höhere Toleranz des Biokatalysators gegenüber Cyanid vorteilhaft, da  $\alpha$ -Hydroxynitrile und  $\alpha$ -Aminonitrile zur Gewährleistung  
10 einer schnellen und vollständigen Umsetzung des Aldehyds bevorzugt mit einem 1-3 %-igen Überschuss an Blausäure hergestellt werden, der zum Teil im Produkt verbleibt. Somit können während der Biotransformation Cyanidkonzentrationen auftreten, die 20 mM übersteigen.  
15 Nebenprodukte und Reagentien wie als Hilfsbasen eingesetzte Amine dürfen die Nitrilhydratase-Aktivität ebenfalls nicht inhibieren.

- Aufgabe der Erfindung ist es, Nitrilhydratasen bereitzustellen, die gegenüber bei der Umsetzung von  
20 Nitrilen zu Amiden in der Reaktionslösung vorhandenen Cyanidionen eine erhöhte Stabilität aufweisen.

- Gegenstand der Erfindung sind isolierte Polynukleotide, insbesondere aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren,  
25 die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den in den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10 enthaltenden Aminosäuresequenzen, wobei die Polypeptide, enthaltend die Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5 oder 7, 8, 10, zusammen jeweils die Aktivität einer cyanidtoleranten  
30 Nitrilhydratase besitzen bzw. diese Nitrilhydratase bilden.

Bevorzugt stammen die Polynukleotide aus *Pseudomonas putida* oder *Pseudomonas marginalis*.

Gegenstand der Erfindung sind weiter Polynukleotide, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotide, enthaltend die oder bestehend aus den Nukleotidsequenzen aus den SEQ ID NO:1, 4, 6, 9 oder dazu komplementären Nukleotidsequenzen,
  - b) Polynukleotide, enthaltend Nukleotidsequenzen, die den Sequenzen aus a) im Rahmen der Degeneriertheit des genetischen Codes entsprechen,
  - 10 c) Polynukleotide enthaltend Nukleotidsequenzen gemäss a), die funktionsneutrale Sinnmutationen enthalten,
  - d) Polynukleotide, die mit den komplementären Sequenzen aus a) oder c) unter stringenten Bedingungen hybridisieren,
- 15 wobei die Polynukleotide für eine cyanidtolerante Nitrilhydratase kodieren.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso die durch diese Polynukleotide kodierte Polypeptide mit den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5 oder 7, 8, 10 mit der Aktivität von

20 cyanidtoleranten Nitrilhydratasen aus Mikroorganismen der Gattung Pseudomonas, die sowohl in den Mikroorganismen angereichert oder in isolierter Form vorliegen können. SEQ ID NO:2 und 7 kodieren für die alpha-Untereinheiten der Nitrilhydratasen, SEQ ID NO:3 und 8 für die beta-

25 Untereinheiten der Nitrilhydratasen und SEQ ID NO:5 und 10 für Aktivatorproteine deren Co-Expression für die Aktivität der Nitrilhydratasen essentiell ist (Nojiri et al., 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704)

Erfindungsgemäß werden bevorzugt Wirtszellen verwendet, die

30 durch die erfindungsgemäßen Polynukleotide transformiert oder transfektiert wurden.

Die Wirtszellen können zu den Eukaryonten oder Prokaryonten zählen, für die ein stabiles Expressionssystem bekannt ist, insbesondere

Als Host-Organismus dienen bevorzugt Mikroorganismen, für  
5 Expressionssysteme gibt, wie z. B. *Pseudomonas*, *Pichia*, verschiedene Hefen, *Saccaromyces*, *Aspergillus* oder der Familie *Streptomyces*, insbesondere *E. coli*. Mikroorganismen der Gattung *Rhodococcus* sind ebenso geeignet.

10 Vektor DNA kann in eukaryonische oder prokaryonische Zellen durch bekannte Transformations- oder Transfektionstechniken eingeführt werden.

„Transformation“, „Transfektion“, „Konjugation“ und „Transduktion“ beziehen sich auf nach dem Stand der  
15 Techniken bekannten Maßnahmen, um fremde DNA einzuführen.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank von *Pseudomonas marginalis*  
20 oder *Pseudomonas putida*, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenzen der erfindungsgemäßen Polynukleotide aus der SEQ ID No:1, 4 oder 6, 9 oder Fragmente davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

25 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodieren, oder um solche  
30 Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenzen mit denen der erfindungsgemäßen Gene aufweisen. Sie können ebenso als Sonde auf sogenannte „arrays“, „micro arrays“

oder "DNA chips" aufgebracht werden, um die entsprechenden Polynukleotide oder hiervon abgeleitete Sequenzen wie z.B. RNA oder cDNA zu detektieren und zu bestimmen.

5 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodieren.

10 Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 25 oder 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge  
15 von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

20 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen Polynukleotide gemäß SEQ ID No:1, 4, 6, 9 oder darin enthaltene Fragmente  
25 und auch solche ein, die zu wenigstens 90 %, 93 %, 95 %, 97 % oder 99% identisch sind mit den Polynukleotiden gemäß SEQ ID NO:1, 4, 6, 9 oder darin enthaltenen Fragmenten.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene  
30 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen Polypeptide gemäß den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10 , und auch solche

ein, die zu wenigstens 90%, und besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit den Polypeptiden gemäß den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10.

- 5 Die aus der gewünschten Genbank erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler  
10 (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

- Kodierende DNA-Sequenzen, die sich den in aus SEQ ID No. 1, 4, 6, 9 enthaltenen Sequenzen durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der  
15 Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit diesen Sequenzen oder Teilen von davon hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen  
20 Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen  
25 Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der  
30 Genetik und Molekularbiologie.

- Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter  
35 Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus



SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, insbesondere von 20, 30 oder 40.

- 5 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.
- 10 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 90%
- 15 identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ
- 20 niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

- Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C
- 25 eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise
- 30 durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist
- 35 gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x

- SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).
- 10 Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

- Im allgemeinen geht man so vor, dass man ein gut exprimierbares Gen in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl, Gene mit schwächerer Expressionsleistung auf einem Vektor mit höherer Kopienzahl und/oder starkem Promotor kloniert. Die Wirtszellen sind mit diesen Vektoren in der Weise transformiert, dass sie im Vergleich zum Startorganismus mindestens jeweils eine zusätzliche Kopie der für die Bildung von Nitrilhydratase kodierenden Nukleotidsequenzen enthalten.
- 20 Die so hergestellten transformierten oder rekombinanten Mikroorganismen insbesondere der Gattung Pseudomonas sind ebenfalls Teil der Erfindung.

- Es wurde gefunden, dass die Verstärkung der für die erfindungsgemäße Nitrilhydratase und das Helferprotein P47K kodierenden Gene in Mikroorganismen zu einer erhöhten Produktion der Nitrilhydratase oder auch zu einer erhöhten Aktivität der Nitrilhydratase führen.
- 30

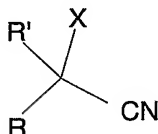
- Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert, im Vergleich zum nicht rekombinierten Startorganismus.
- 10 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch
- 15 induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.
- 20 Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin
- 25 eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso

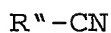
- 1) ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Amiden aus Nitrilen, das folgende Schritte aufweist:
- 30 a) Umsetzung einer (eine) Nitrilgruppe(n) enthaltenden Verbindung mit einem mikrobiellen Enzym, das Nitrilhydratase-Aktivität aufweist und

- b) Abtrennung des gebildeten Amids, wobei man
- c) für die Umsetzung des Nitrils zum Amid eine erfindungsgemäße Nitrilhydratase einsetzt. Deren Restaktivität beträgt nach der Umsetzung von
- 5 Methacrylnitril in Gegenwart von 20 mM (mM = mmol/l) Cyanidionen bei 20°C nach 30 min. bevorzugt mindestens 90 % der Restaktivität desselben Enzyms, wenn dieses das unter ansonsten denselben Bedingungen in Abwesenheit von
- 10 Cyanidionen für die Umsetzung eingesetzt wurde.
- 2) ein Verfahren gemäß 1), dadurch gekennzeichnet, dass die Restaktivität nach der Umsetzung in Gegenwart von 50 mM Cyanidionen mindestens 60 % beträgt,
- 3) ein Verfahren gemäß 1) oder 2), dadurch
- 15 gekennzeichnet, dass man das Enzym produzierende und enthaltende Mikroorganismen oder deren Lysat einsetzt.
- 4) ein Verfahren gemäß 3), dadurch gekennzeichnet, dass man ruhende Zelle des Mikroorganismus einsetzt,
- 5) ein Verfahren gemäß 1) oder 2), dadurch
- 20 gekennzeichnet, dass man das gereinigte Enzym einsetzt,
- 6) ein Verfahren gemäß 1) bis 5), dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* stammt, insbesondere *Pseudomonas putida*
- 25 oder *Pseudomonas marginalis*,
- 7) ein Verfahren gemäß 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* stammt, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276, und die Aminosäuresequenzen mit den
- 30 Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10 aufweisen,

- 8) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 7), dadurch gekennzeichnet, dass man Verbindungen der allgemeinen Formeln



(I)



(II)

in der bedeuten:

X: OH, H, Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen, NH<sub>2</sub>

10 R: H, gesättigter Alkylrest mit 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder unverzweigt, gegebenenfalls NH<sub>2</sub>-substituiert

ungesättigte Alkylreste mit einer Doppelbindung und 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder  
15 unverzweigt, Cycloalkylgruppen mit 3 bis 6 C-Atomen,

mit Alkylthiogruppen substituierte

Alkylenreste, wobei Alkyl hier einem C<sub>1</sub> bis C<sub>3</sub>-Rest

20 und Alkylen einem zweiwertigen C<sub>3</sub> bis C<sub>8</sub>-Rest entspricht,

R': H, wenn R kein H bedeutet, Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen,

25 R'': ein- oder zweikerniger ungesättigter Ring, mit 6 bis 12 C-Atomen, gegebenenfalls substituiert mit einer oder zwei Alkylgruppen (C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>), Cl, BR, F substituiert,

einwertiger Alkylnitrilrest mit 1 bis 6 C-Atomen zu den entsprechenden Amiden umgesetzt,

- 30 9) ein Verfahren gemäß 8), dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel(I) in

Gegenwart von Blausäure oder einem Salz der Blausäure umgesetzt,

- 10) ein Verfahren gemäß 9), dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung in Gegenwart von 0,1 mol% Cyanid bis 3 mol% Cyanid bezogen auf das eingesetzte Nitril durchführt, bevorzugt > 2 bis 3 mol%. Dies entspricht bei 1 mol Endkonzentration bei 3 mol% 30 mMol Cyanid,
- 11) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 10), dadurch gekennzeichnet; dass man als Nitril Methioninnitril einsetzt,
- 12) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 10), dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-Hydroxy-4-methylthiobutyronitril einsetzt.

Bevorzugt setzt man ein Reaktionsgemisch ein, wie man es erhält, wenn man Blausäure, 3-Methylthiopropionaldehyd in Gegenwart einer Hilfsbase wie z.B. Triethylamin nach dem Stand der Technik umsetzt.

Es kann vorteilhaft ohne Aufreinigung eingesetzt werden.

Dies weist auf die zusätzliche Stabilität der erfindungsgemäßen Enzyme gegenüber Aldehyden und Aminen hin.

- 13) Ein Verfahren, bei dem man als Vorstufe für Methacrylamid 2-Hydroxy-2-methylpropionitril, einsetzt.

- 14) Die Erfindung ist ebenso ausgerichtet auf isolierte und gereinigte Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275 (MA32, *Pseudomonas marginalis*) und DSM 16276 (MA113, *Pseudomonas putida*), und

- 15) Cyanidtolerante Nitrilhydratasen, isoliert aus den  
Stämmen der Gattung *Pseudomonas*, insbesondere aus den  
unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276 hinterlegten  
Stämmen von *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas*  
5 *marginalis*.

Die Hinterlegung erfolgte am 09.03.2004 bei der DSMZ,  
Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in  
Braunschweig, nach dem Budapester Vertrag.

- 10 Diese Stämme sind besonders geeignet, die erfindungsgemäßen  
Enzyme zu produzieren.

„Isolierte und gereinigte Mikroorganismen“ betrifft  
Mikroorganismen, die in einer höheren Konzentration als  
natürlich zu finden vorliegen.

- 15 Gegenstand der Erfindung ist ebenso ein Verfahren zur  
Herstellung der oben beschriebenen cyanidtoleranten  
Nitrilhydratase, bei dem man

- a) einen diese Nitrilhydratase produzierenden  
Mikroorganismus, insbesondere der Gattung *Pseudomonas*  
*marginalis* oder *Pseudomonas putida*, unter Bedingungen  
20 fermentiert, bei denen sich das Enzym in dem  
Mikroorganismus bildet, und
- b) frühestens nach dem Durchlaufen der logarithmischen  
Wachstumsphase die Zellen erntet.

Anschließend setzt man

- 25 a) entweder den das Enzym enthaltenden Mikroorganismus als  
in Form von ruhenden Zellen, gegebenenfalls nach der  
Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran oder
- b) das Lysat der Zellen oder
- c) das aus den Zellen des Mikroorganismus mit bekannten  
30 Maßnahmen isolierte Enzym

zur erfindungsgemäßen Umwandlung von Nitrilen in Amide ein.

Bei der Nitrilhydratase kann es sich sowohl um ein mit nicht rekombinanten Mikroorganismen erzeugtes als auch um ein rekombinant erzeugtes Enzym handeln.

- 5 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide, wobei man einen diese Polypeptide produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der zugehörigen Polynukleotide induziert und  
10 die Enzyme gegebenenfalls aus der Kultur isoliert.

Es handelt sich im allgemeinen um ein Verfahren, bei dem man

- a) Mikroorganismen insbesondere der Gattungen *Pseudomonas* *marginalis* oder *Pseudomonas* *putida* fermentiert, in  
15 denen man isolierte Polynukleotide aus Mikroorganismus der Familie *Pseudomonas*, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren, die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den Sequenzen in den SEQ ID NO:2, 3 und 5 oder 7, 8 und 10 enthaltenden  
20 Aminosäuresequenzen, wobei die Polypeptide jeweils gemeinsam die Aktivität einer cyanidtoleranten Nitrilhydratase besitzen, verstärkt, insbesondere rekombinant überexprimiert,
- b) aus diesen Mikroorganismen das Enzym mit  
25 Nitrilhydrataseaktivität gegebenenfalls isoliert oder eine dieses Enzym enthaltende Proteinfraction herstellt, und
- c) die Mikroorganismus gemäss a) oder das Enzym gemäss oder die dieses enthaltende Fraktion b) in ein Medium  
30 überführt, das ein Nitrilgruppen-haltige Verbindung der allgemeinen Formeln (I) und (II) enthält.



Das zur Fermentation verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for  
5 General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B.  
10 Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

15 Als Stickstoffquelle können vorteilhaft organische Nitrile oder Säureamide wie Acetonitril, Acetamid, Methacrylnitril, Methacrylamid, Isobutyronitril, Isobutyramid oder Harnstoff auch in Kombination mit anderen Stickstoffhaltigen Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt,  
20 Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung  
25 verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten  
30 wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen

Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

- 5 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder
- 10 Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 10°C bis 40°C und vorzugsweise bei 10°C bis 30°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sie die logarithmische Wachstumsphase durchschritten hat. Dieses
- 15 Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 70 Stunden erreicht. Im Anschluss daran werden die Zellen bevorzugt geerntet, gewaschen und in einem Puffer als Suspension bei einem pH-Wert von 6-9, insbesondere von 6,8 bis 7,9 aufgenommen. Die Zellkonzentration beläuft sich auf
- 20 1-25%, insbesondere 1,5 bis 15% (Feuchtgewicht/v). Die Permeabilität kann mit physikalischen oder chemischen Methoden so, z. B. mit Toluol wie bei Wilms et al., J. Biotechnol., Vol. 86 (2001), 19-30 beschrieben, erhöht werden, dass das umzuwandelnde Nitril die Zellwand
- 25 durchdringen und das Amid austreten kann.

Folgende Nitrile werden bevorzugt umgesetzt:

gesättigte Mononitrile:

Acetonitril, Propionitril, Butyronitril, Isobutyronitril, Valeronitril, Isovaleronitril, Capronitril

- 30 gesättigte Dinitrile:

Malonitril, Succinonitril, Glutaronitril, Adiponitril

aromatische unsubstituierte und substituierte Mono- und Dinitrile:

Benzonitril, 2,6-Difluorbenzonitril, Phthalonitril, Isophthalonitril, Terephthalonitril,

$\alpha$ -Aminonitrile:

- 5  $\alpha$ -Aminopropionitril,  $\alpha$ -Aminomethylthiobutyronitril,  $\alpha$ -Aminobutyronitril, Aminoacetonitril, alle von natürlichen Aminosäuren abgeleitete Nitrile,  $\alpha$ -Amino-3,3-dimethylpropionitril  $\alpha$ -Amino-2,3-dimethylpropionitril

Nitrile mit Carboxyl-Gruppen:

Cyanessigsäure

- 10  $\beta$ -Aminonitrile:

Amino-3-propionitril

ungesättigte Nitrile:

Acrylnitril, Methacrylonitril, Allylcyanid, Crotononitril

$\alpha$ -Hydroxynitrile:

- 15  $\alpha$ -Hydroxy-n-propionitril,  $\alpha$ -Hydroxy-n-butyronitril,  $\alpha$ -Hydroxy-isobutyronitril,  $\alpha$ -Hydroxy-n-hexanonitril,  $\alpha$ -Hydroxy-n-heptanonitril,  $\alpha$ -hydroxy-n-octanonitril,  $\alpha,\gamma$ -Dihydroxy- $\beta,\beta$ -dimethylbutyronitril, Acroleincyanohydrin, Methacrylaldehyd cyanohydrin, 3-Chlorolactonitril, 4-  
20 Methylthio- $\alpha$ -hydroxybutyronitril und  $\alpha$ -Hydroxy-phenylpropionitril.

Die Konzentration der umzusetzenden Nitrile in der Reaktionslösung ist nicht auf bestimmte Bereiche begrenzt.

- Um eine Inhibierung der Enzymaktivität durch das Substrat  
25 zu vermeiden, hält man die Konzentration des Nitrils im allgemeinen auf 0,02 bis 10 w/w%, insbesondere 0,1 bis 2 w/w%, bezogen auf die Menge des Biokatalysators als getrocknete Zellmasse. Das Substrat kann zu Beginn der Umsetzung insgesamt oder im Verlauf der Umsetzung  
30 kontinuierlich oder diskontinuierlich zugesetzt werden.

Die Bestimmung des Trockengewichts erfolgt mit dem Moisture Analyser MA 45 (Sartorius).

Wenn die Löslichkeit der Nitrilverbindung in dem wässrigen Reaktionssystem zu gering ist, kann ein Lösungsvermittler  
5 zugesetzt werden.

Die Reaktion kann aber alternativ auch in einem Zweiphasensystem Wasser/organische Lösungsmittel durchgeführt werden.

Bei der Verwendung von Zellen des Mikroorganismus als  
10 enzymatisch aktivem Material, ist die Menge der eingesetzten Zellen im Verhältnis zur Substratmenge bevorzugt 0,02 bis 10 w/w% als getrocknete Zellmasse.

Es ist auch möglich, das isolierte Enzym nach allgemein bekannten Techniken zu immobilisieren und in dieser Form  
15 dann einzusetzen.

Die Reaktion wird im allgemeinen bei Temperaturen von -5°C bis 50°C, insbesondere 0°C bis 30°C, und einer Zeitdauer von 0,1 bis 100 Stunden durchgeführt.

Der einzuhaltende pH-Wert des Reaktionsgemisches ist so  
20 lange nicht auf bestimmte Werte begrenzt, wie die enzymatische Aktivität nicht beeinträchtigt wird. Nach der Umsetzung kann das gebildete Amid aus der Reaktionslösung wie bekannt abgetrennt und gereinigt werden.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren, bei  
25 dem man das Amid bzw. die das Amid enthaltende Lösung zum Beispiel von den Zellen der Biomasse abtrennt und das Amid entweder zu der entsprechenden Säure verseift oder unter Zusatz von Alkali- oder Erdalkalimetallyhydroxiden zu den entsprechenden Salzen der Säuren umsetzt. Bevorzugt wird  
30 MHA-Amid mit Calciumhydroxid verseift und das entsprechende Calciumsalz isoliert.

## Beispiele

## Beispiel 1

## Anzuchtbedingungen

- Die Vorkulturen wurden innerhalb von 24 h unter Schütteln  
 5 bei 30°C in einem Volumen von 5 ml in Glasröhrchen  
 angezogen. Mit 1 ml der Vorkultur wurden 100 ml der  
 Hautkultur angeimpft und 42 h bei 25°C in einem  
 Erlenmeyerkolben mit einem Gesamtvolumen von 1000 ml  
 geschüttelt.

Medium für die Vorkultur (pH 7,0)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Na-citrat	0,5 g
Glycerin	2 g
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,004 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0.1 g
Acetamid	2 g
Spurensalzlösung	0,1 ml
Demineralisiertes Wasser	Ad. 1000 ml

10

Medium für die Hauptkultur (pH 7,0)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Natriumcitrat	0,5 g
Glycerin	2 g
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,004 g

MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0.1 g
Acetamid	10 g
Spurensalzlösung	0,1 ml
Demineralisiertes Wasser	Ad. 1000 ml

Spurensalzlösung	
EDTA, Na <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	158 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	4,7 mg
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	70 mg
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	18 mg
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	16 mg
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	4,7 mg
CoSO <sub>4</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	5,2 mg
Demineralisiertes Wasser	Ad. 1000 ml

## Beispiel 2

### Isolierung und Identifizierung der Mikroorganismen

- 5 Die beiden Stämme MA32 und MA113 wurden durch Bestimmung der Nitrilhydratase-Aktivität der Ruhezellen in Gegenwart von 2 mM Kaliumcyanid selektiert.

### Eigenschaften von MA32:

	Zellform	Stäbchen
10	Breite	0,6 - 0,8 µm
	Länge	1,5 - 3,0 µm

	Beweglichkeit	+
	Geißeln	polar > 1
5	Gram-Reaktion	-
	Lyse durch 3% KOH	+
	Aminopeptidase (Cerny)	+
	Oxidase	+
	Katalase	+
10	Wachstum bei 41°C	-
	Substratverwertung	
	Adipat	-
15	Citrat	+
	Malat	+
	Phenylacetat	-
	D-Glucose	+
	Maltose	-
20	Mannitol	+
	Arabinose	+
	Mannose	+
	Trehalose	+
	Sorbitol	+
25	Erythrol	+
	Citraconat	+
	Inositol	+
	ADH	+
30	Urease	-
	Hydrolyse von Gelatine	+
	Hydrolyse von Esculin	+
35	Levan aus Saccharose	+
	Denitrification	+
	Lecithinase	+
40	Fluoreszens	+
	Pyocyanin	-
45	Das Profil der zellulären Fettsäuren ist typisch für die Gruppe I der Pseudomonaden	
	Die Analyse eines 484 bp langen Abschnitts der 16S rRNA ergab eine 100%-ige Übereinstimmung mit der Sequenz von <i>Pseudomonas marginalis</i>	

Unter Berücksichtigung aller Daten konnte MA32 als *Pseudomonas marginalis* identifiziert werden.

5	Eigenschaften von MA113:	
	Zellform	Stäbchen
	Breite	0,6 - 0,8 µm
	Länge	1,5 - 3,0 µm
10	Beweglichkeit	+
	Geißeln	polar > 1
	Gram-Reaktion	-
	Lyse durch 3% KOH	+
15	Aminopeptidase (Cerny)	+
	Oxidase	+
	Katalase	+
	Wachstum bei 41°C	-
20	Substratverwertung	
	Adipat	-
	Citrat	+
	Malat	+
25	Phenylacetat	+
	D-Glucose	+
	Maltose	-
	Mannitol	-
	Arabinose	-
30	Mannose	-
	Trehalose	-
	Inositol	-
	β-Alanin	+
	α-Ketoglutarat	+
35	Benzylamin	+
	Hippurat	+
	Azelat	+
	D-Mandelat	+
40	ADH	+
	Urease	-
	Hydrolyse von Gelatine	-
	Hydrolyse von Esculin	-
45	Levan aus Saccharose	-



Denitrification -

Lecithinase -

5

Fluoreszens +

Pyocyanin -

10 Das Profil der zellulären Fettsäuren ist typisch für die Gruppe I der Pseudomonaden

Die Analyse eines 476 bp langen Abschnitts der 16S rRNA ergab eine 100%-ige Übereinstimmung mit der Sequenz von *Pseudomonas putida*

15

Unter Berücksichtigung aller Daten konnte MA113 als *Pseudomonas putida* identifiziert werden.

### Beispiel 3

20 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Die Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen, durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt und im Standardpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5)

resuspendiert. 50 µl dieser Zellsuspension wurden zu 700 µl

25 des Standardpuffers gegeben und zum Starten der Reaktion mit 250 µl einer 200 mM Lösung des Nitrils in

Standardpuffer versetzt. Die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension war hierbei so bemessen, daß das Nitril nach 10 min bei 20°C zu 5-30 % umgesetzt war. Nach 10 min

30 bei 20°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl halbkonzentrierter Phosphorsäure abgestoppt und die Zellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt.

HPLC-Analytik	
Säule	Intersil ODS-3V (GL Sciences Inc.)
Mobile Phase	Gemisch aus 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,3 und Acetonitril im Verhältnis 85:15 für Methioninnitril, MHA-Nitil und Acetoncyanhydrin bzw. 99:1 für alle anderen Substrate
Flußrate	1 ml/min
Detektion	UV bei 200 nm

Die Aktivität von einem U ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol Methacrylnitril in einer Minute zum Amid umsetzt. Entstand neben dem Amid auch die Säure, wurde ein  
 5 U definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol Methacrylnitril in einer Minute zu Amid und Säure umsetzt.

In Abbildung 1 und in Abbildung 2 werden die relative Aktivitäten der Stämme MA32 und MA113 dargestellt.

#### Beispiel 4

#### 10 Einfluß von Cyanid auf die Aktivität der Nitrilhydratase

50 µl einer analog zu Beispiel 3 hergestellten Zellsuspension wurden zu 700 µl des Standardpuffers gegeben, der 0; 21,4; 53,6 und 107,1 mM Kaliumcyanid enthielt (Endkonzentration 0, 20, 50, 100 mM Cyanid. Zum  
 15 starten der Reaktion wurden 200 µl einer 200 mM Lösung des Nitrils im Standardpuffer zugesetzt, der jeweils die selbe Cyanidkonzentration aufwies wie die übrige Reaktionslösung. Die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension war hierbei so bemessen, daß das Nitril im Ansatz ohne Cyanid  
 20 nach 10 min bei 20°C zu 16 % umgesetzt war. Nach 10 min bei 20°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl halbkonzentrierter Phosphorsäure abgestoppt und der Umsatz wurde analog zu Beispiel 2 bestimmt.

In Abbildung 3 und in Abbildung 4 werden die relativen Aktivitäten für die Umsetzung von Methacrylnitril in Abhängigkeit von der Cyanidkonzentration wiedergegeben.

#### Beispiel 5

- 5 Umsetzung von Acetoncyanhydrin mit *Pseudomonas marginalis* MA32 Ruhezellen

*Pseudomonas marginalis* MA32 Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen und abzentrifugiert. Eine solche Menge der Zellen, die 1,16 g Biotrockenmasse enthielt, wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 auf ein Endvolumen von 50 ml verdünnt. Zusätzlich wurden dem Reaktionsgemisch 0,02 mM 2-Methyl-1-propanboronsäure zugesetzt. Frisch destilliertes Acetoncyanhydrin wurde bei 4°C unter heftigem Rühren kontinuierlich mit einer solchen Rate zugegeben, daß die Konzentration während der Reaktion 5 g/L zu keinem Zeitpunkt überschritt. Der pH wurde konstant bei 7,5 gehalten. Die Reaktionsverfolgung wurde mittels HPLC wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Nach 140 min waren 10,0 g des Nitrils vollständig zu 10,7 g Amid und 1,4 g Säure umgesetzt worden.

In Abbildung 5 wird der mit dem Stamm MA113 erzielte zeitliche Reaktionsablauf dargestellt.

#### Beispiel 6

- 25 Umsetzung von rohem MHA-Nitril mit *Pseudomonas marginalis* MA32 Ruhezellen

*Pseudomonas marginalis* MA32 Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen und abzentrifugiert. Eine solche Menge der Zellen, die 0,34 g Biotrockenmasse enthielt, wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 auf ein Endvolumen von 70 ml verdünnt. Zusätzlich wurden dem Reaktionsgemisch 0,02 mM 2-Methyl-1-propanboronsäure zugesetzt. Das rohe MHA-Nitril wurde bei 4°C unter heftigem

Rühren kontinuierlich mit einer solchen Rate zugegeben, daß die Konzentration während der Reaktion 10 g/L zu keinem Zeitpunkt überschritt. Der pH wurde konstant bei 8,0 gehalten. Die Reaktionsverfolgung wurde mittels HPLC wie in  
5 Beispiel 2 beschrieben durchgeführt. Nach 510 min waren 10,05 g des Nitrils vollständig zu 11,13 g Amid und 0,31 g Säure umgesetzt worden. Das entspricht einer Endkonzentration von 139 g Amid pro Liter.

Das MHA-Nitril war direkt aus 3-Methylthiopropionaldehyd  
10 und einem leichten Überschuss an Blausäure hergestellt worden. Eine 50 mM Lösung dieses MHA-Nitrils in Wasser enthielt 0,5 mM Cyanid (Spektroquant®, Merck).

In Abbildung 6 wird der mit dem Stamm MA32 erzielte zeitliche Reaktionsablauf dargestellt.

#### 15 Beispiel 7

Klonierung des Nitrilhydratase-Gen-clusters aus *Pseudomonas marginalis* MA 32 und Konstruktion eines Expressionsvektors

Der Gen-Cluster der Nitrilhydratase enthaltend eine  $\alpha$ -Untereinheit,  $\beta$ -Untereinheit und einem Nitrilhydratase-  
20 Aktivatorprotein, dessen Co-Expression für die Aktivität der Nitrilhydratase essentiell ist (Nojiri et al., 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704), wurde mit den Primern 1F und 1R per PCR amplifiziert, die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NdeI und HindIII eingefügten. Das  
25 so erhaltene PCR-Produkt wurde in einen mit NdeI und HindIII geschnittene Vektor ligiert, bei dem die eingefügten Gene unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors stehen. Der so entstandene Expressionsvektor heißt pKE31.

Die Restriktionskarte findet sich in Abbildung 7, die  
30 Sequenz unter SEQ ID NO:1.

Das Expressionsplasmid wurde in den Stamm *E. coli* DSM 14459 transformiert, der bei der Deutschen Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) am 22.08.2001 hinterlegt worden ist.

Primer:

1F	5'-CTC CAC CAT ATG AGT ACA GCT ACT TCA ACG -3'
1R	5'-CTT CAT AAG CTT CTA TCT CGG ATC AAA TGG-3'

5 1F: SEQ ID NO:11

1R: SEQ ID NO:12

Die Gene befinden sich auf den Abschnitten von SEQ ID NO:1:

Gen der  $\alpha$ -Untereinheit: nt 25-609

Gen der  $\beta$ -Untereinheit: nt 650-1312

10 Gen des Aktivatorproteins: nt 1309-2577

#### Beispiel 8

Klonierung des Nitrilhydratase-Gen-clusters aus *Pseudomonas putida* MA113

15 Der Gen-Cluster der Nitrilhydratase bestehend aus  $\alpha$ -Untereinheit,  $\beta$ -Untereinheit und einem Nitrilhydratase-Aktivatorprotein, dessen Co-Expression für die Aktivität der Nitrilhydratase essentiell ist (Nojiri et al., 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704), wurde mit den Primern 1F und 1R per PCR amplifiziert.

20 Die Sequenz findet sich unter SEQ ID NO:6.

Primer:

2F	5'-ATG ACG GCA ACT TCA ACC CCT GGT G-3'
2R	5'-TCA GCT CCT GTC GGC AGT CG-3'

2F:SEQ ID NO:13

2R:SEQ ID NO:14

Die Gene befinden sich auf den Abschnitten von SEQ ID NO:5:

	Gen der $\alpha$ -Untereinheit:	nt	1-582
5	Gen der $\beta$ -Untereinheit:	nt	624-1286
	Gen des Aktivatorproteins:	nt	1283-2360

#### Beispiel 9

Heterologe Expression der Nitrilhydratasen aus *Pseudomonas marginalis* MA 32 in *E. coli* DSM 14459

10 *E. coli* DSM 14459 wurde im Zusammenhang mit der DE 101 55 928 hinterlegt.

Die mit pKE31 transformierten Zellen wurden in LB-Medium (LB Bouillon nach Miller, VWR), das 2 mM Eisen(III)-Citrat und 100  $\mu$ g/ml Ampicillin enthielt, unter Schütteln bei 37°C  
15 angezogen. Nach 12 - 16 Stunden wurde eine solche Menge der Vorkultur in eine Hauptkultur überimpft, dass diese eine OD600 von 0,1 aufwies. Das Kulturmedium der Hauptkultur entsprach dem der Vorkultur, enthielt aber zusätzlich 2 g/L L-Rhamnose. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 22 stündiger  
20 Kultivierung bei 30°C.

#### Beispiel 10

Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten

Die Anzucht der Zellen und die Bestimmung der Aktivität wurden wie in Beispiel 9 und Beispiel 3 beschrieben  
25 durchgeführt.

Die mit dem Plasmid pKE31 transformierten Zellen des Stamms *E. coli* DSM 14459 wiesen eine spezifische Aktivität von 17 U/mg BTM auf.

### Beispiel 11

Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten in Gegenwart von 100 mM Kaliumcyanid

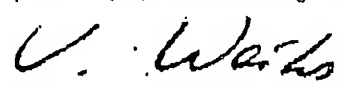
Die Anzucht der Zellen und die Bestimmung der Aktivitäten  
5 in Gegenwart von 100 mM Kaliumcyanid wurden wie in Beispiel 9 und Beispiel 4 beschrieben durchgeführt.

Die mit dem Plasmid pKE31 transformierten Zellen des Stamms E. coli DSM 14459 wiesen eine spezifische Aktivität von 11 U/mg BTM auf.

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG  
Projekthaus Biotechnologie  
Rodenbacher Chaussee  
63457 Hanau

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeleitetes Bezugszeichen: JM109 (deltarhab)	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeleitete EINGANGSNUMMER:  DSM 14459
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>( ) eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p>(X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-08-22 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:   Datum: 2001-08-24

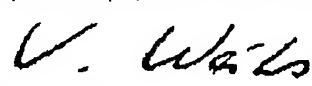
<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.



## INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG  
Projekthaus Biotechnologie  
Rodenbacher Chaussee  
63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Degussa AG Projekthaus Biotechnologie Anschrift: Rodenbacher Chaussee 63457 Hanau	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 14459 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 2001-08-22
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2001-08-22 <sup>1</sup> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus  <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHFÜHRT WORDEN IST <sup>2</sup>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:   Datum: 2001-08-24

<sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.


<sup>3</sup> Zutreffendes ankreuzen.

<sup>4</sup> Ausfüllen, wenn die Angaben benannt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG  
Service Center Biokatalyse  
Rodenbacher Chaussee 4  
63457 Hanau

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE


I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:  MA32	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER:  DSM 16275
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde  ( ) eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung  eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2004-03-04 (Datum der Erst- hinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:    Datum: 2004-03-09

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG  
Service Center Biokatalyse  
Rodenbacher Chaussee 4  
63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name:	Degussa AG Service Center Biokatalyse Rodenbacher Chaussee 4 63457 Hanau	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER:  DSM 16275  Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung <sup>1</sup> :  2004-03-04	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2004-03-08 <sup>2</sup> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus			
<input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> lebensfähig <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST <sup>4</sup>			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name:	DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:	
Anschrift:	Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	 Datum: 2004-03-09	

- <sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.  
<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.  
<sup>3</sup> Zutreffendes ankreuzen.  
<sup>4</sup> Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.



## INTERNATIONALES FORMBLATT


Degussa AG

Service Center Biokatalyse

Rodenbacher Chaussee 4

63457 Hanau

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE


I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: <b>MA113</b>	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER:  <b>DSM 16276</b>
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde  <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am <b>2004-03-04</b> (Datum der Erst- hinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am _____ eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am _____ eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: <b>DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</b>  Anschrift: <b>Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</b>	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:    Datum: <b>2004-03-09</b>

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG  
Service Center Biokatalyse  
Rodenbacher Chaussee 4  
63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Degussa AG Service Center Biokatalyse Anschrift: Rodenbacher Chaussee 4 63457 Hanau	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 16276 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung <sup>1</sup> : 2004-03-04
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2004-03-08 <sup>2</sup> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> lebensfähig <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST <sup>4</sup>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:   Datum: 2004-03-09

<sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.  
<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.  
<sup>3</sup> Zutreffendes ankreuzen.  
<sup>4</sup> Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

0-1	Formular PCT/RO/134 (SAFE) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material	
0-1-1	erstellt mit	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.169)
0-2	Internationales Aktenzeichen	
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	040061 BT
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	30-31
1-2	Zeile	-
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	22. August 2001 (22.08.2001)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 14459
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten
2	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
2-1	Seite	32-33
2-2	Zeile	-
2-3	Angaben betr. Hinterlegung	
2-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH
2-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
2-3-3	Datum der Hinterlegung	04. März 2004 (04.03.2004)
2-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 16275
2-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten

<b>3</b>	<b>Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist</b>	
<b>3-1</b>	<b>Seite</b>	<b>34-35</b>
<b>3-2</b>	<b>Zeile</b>	<b>-</b>
<b>3-3</b>	<b>Angaben betr. Hinterlegung</b>	
<b>3-3-1</b>	<b>Name der Hinterlegungsstelle</b>	<b>DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</b>
<b>3-3-2</b>	<b>Anschrift der Hinterlegungsstelle</b>	<b>Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany</b>
<b>3-3-3</b>	<b>Datum der Hinterlegung</b>	<b>04. März 2004 (04.03.2004)</b>
<b>3-3-4</b>	<b>Eingangsnummer</b>	<b>DSMZ 16276</b>
<b>3-5</b>	<b>Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden</b>	<b>alle Bestimmungsstaaten</b>

## VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

<b>0-4</b>	<b>Dieses Formular ist mit der internationalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)</b>	<b>ja</b>
<b>0-4-1</b>	<b>Bevollmächtigter Bediensteter</b>	<b>Y. Marinus-v.d. Nieuwenhuis</b>

## VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

<b>0-5</b>	<b>Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen</b>	
<b>0-5-1</b>	<b>Bevollmächtigter Bediensteter</b>	

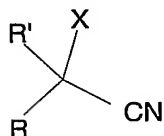
## Patentansprüche

1. Isolierte Polynukleotide, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren, die zu 90 bis 100 %  
5 identisch sind mit den in den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3 und 5 oder 7, 8 und 10 enthaltenden Aminosäuresequenzen.
2. Polynukleotide gemäss Anspruch 1, ausgewählt aus der Gruppe:
  - 10 a) Polynukleotide, enthaltend die Nukleotidsequenzen SEQ ID NO:1, 4, 6, 9 oder dazu komplementäre Nukleotidsequenzen,
  - b) Polynukleotide enthaltend Nukleotidsequenzen, die  
15 den Sequenzen aus a) im Rahmen der Degeneriertheit des genetischen Codes entsprechen,
  - c) Polynukleotide enthaltend Nukleotidsequenzen gemäss a), die funktionsneutrale Sinnmutationen enthalten,
  - d) Polynukleotide, die mit den komplementären  
20 Sequenzen aus a) unter stringenten Bedingungen hybridisieren, wobei unter stringenten Bedingungen das Waschen in 5XSSC bei einer Temperatur von 50 bis 65°C verstanden wird,  
wobei die Polynukleotide für eine cyanidtolerante  
25 Nitrilhydratase kodieren.
3. Polypeptide, enthaltend Aminosäuresequenzen, die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den Sequenzen mit den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3 und 5 oder 7, 8 und 10.
4. Polypeptide mit der Aktivität von cyanidtoleranten  
30 Nitrilhydratasen gemäß Anspruch 3, deren Restaktivität



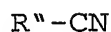
- nach der Umsetzung von Methacrylnitril in Gegenwart von 20 mM (mM=mmol/l) Cyanidionen bei 20°C nach 30 min. mindestens 90 % der Restaktivität desselben Enzyms beträgt, wenn diese unter ansonsten denselben Bedingungen in Abwesenheit von Cyanidionen für die Umsetzung eingestuft wurde.
- 5
5. Sonde oder Primer, enthaltend mindestens 20 aufeinanderfolgende Nukleotide aus den Sequenzen SEQ ID NO:1, 4, 6, 9.
  - 10 6. Vektoren, enthaltend ein Polynukleotid, ausgewählt aus den gemäss den Ansprüchen 1 oder 2.
  7. Wirtszelle, transformiert oder transfektiert durch die Einführung eines Polynukleotids gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 1 oder 2.
  - 15 8. Wirtszelle, transformiert durch die Einführung eines Vektors gemäss Anspruch 6.
  9. Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Amiden aus Nitrilen, das folgende Schritte aufweist:
    - 20 a) Umsetzung einer Nitrilgruppen enthaltenden Verbindung mit einem mikrobiellen Enzym (Polypeptid), das Nitrilhydratase-Aktivität aufweist und
    - b) Abtrennung des gebildeten Amids
  - wobei man für die Umsetzung des Nitrils zum Amid eine cyanidtolerante Nitrilhydratase gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 einsetzt.
  - 25
  10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man das genannte Enzym produzierende und enthaltende Mikroorganismen gemäss den Ansprüchen 7 oder 8 oder deren Lysat einsetzt.
  - 30

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man ruhende Zelle des Mikroorganismus einsetzt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man eine gereinigte Nitrilhydratase einsetzt.
- 5 13. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* stammt.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus eingesetzten Mikroorganismen der Species *Pseudomonas putida* oder *Pseudomonas marginalis* stammt.
- 10 15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die eingesetzten Mikroorganismen unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276 hinterlegt sind.
- 15 16. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man Verbindungen der allgemeinen Formel



20

(I)



(II)

in der bedeuten:

X: OH, H, Alkyl, NH<sub>2</sub>;

25

R: H, gesättigter Alkylrest mit 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder unverzweigt, gegebenenfalls NH<sub>2</sub>-substituiert, ungesättigte Alkylreste mit einer Doppelbindung und 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder

- unverzweigt, Cycloalkylgruppen mit 3 bis 6 C-  
Atomen,  
mit Alkylthiogruppen substituierte  
Alkylenreste, wobei Alkyl hier einem C<sub>1</sub> bis C<sub>3</sub>-  
Rest  
und Alkylen einem zweiwertigen C<sub>3</sub> bis C<sub>8</sub>-Rest  
entspricht,  
R': H, Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen,  
R'': ein- oder zweikerniger ungesättigter Ring, mit 6  
bis 12 C-Atomen, gegebenenfalls mit einer oder  
zwei Alkylgruppen (C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>), Cl, Br, F.  
Alkylnitrilrest mit 1 bis 6 C-Atomen  
zu den entsprechenden Amiden umgesetzt.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet,  
dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) in  
Gegenwart von Blausäure oder einem Salz der Blausäure  
umsetzt.
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet,  
dass man die Umsetzung in Gegenwart einer  
Anfangskonzentration von mehr als 0,5 mol% Cyanid bis  
3 mol% Cyanid, bezogen auf das eingesetzte Nitril,  
durchführt.
19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9  
bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-  
Amino-4-methylthiobutyronitril einsetzt.
20. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9  
bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-  
Hydroxy-4-methylthiobutyronitril einsetzt,  
gegebenenfalls enthalten in der Reaktionsmischung aus  
der Herstellung dieses Nitrils.
21. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9  
bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-  
Hydroxy-2-methylpropionitril einsetzt.

22. Verfahren gemäss den Ansprüchen 9 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass man das Amid bzw. die das Amid enthaltende Lösung von den Zellen der Biomasse trennt und das Amid zu der entsprechenden Säure verseift.
- 5 23. Verfahren gemäss den Ansprüchen 9 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass man das Amid bzw. die das Amid enthaltende Lösung von den Zellen der Biomasse trennt und das Amid mit Alkali- oder  
10 Erdalkalimetallhydroxiden zu den Salzen der entsprechenden Carbonsäuren verseift.
24. Verfahren gemäss Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass man MHA-Amid mit Calciumhydroxid verseift und das Calciumsalz gewinnt.
- 15 25. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 24, wobei man
- a) Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* fermentiert, in denen man isolierte Polynukleotide, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren, die zu 90 bis 100 %  
20 identisch sind mit den in den Sequenzen mit den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10 enthaltenden Aminosäuresequenzen, wobei die Polypeptide die Aktivität einer cyanidtoleranten Nitrilhydratase besitzen, verstärkt, insbesondere rekombinant überexprimiert,  
25
- b) aus diesen Mikroorganismen das rekombinant erzeugte Enzym mit Nitrilhydrataseaktivität gegebenenfalls isoliert oder eine dieses Enzym enthaltende Proteinfraktion herstellt, und
- 30 c) die Mikroorganismen gemäss a) oder das Enzym oder die dieses enthaltende Fraktion gemäss b) in ein Medium überführt, das eine Nitrilgruppen-haltige

Verbindung der allgemeinen Formeln (I) oder (II) enthält.

26. Verfahren gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 9  
bis 24, wobei man Wirtszellen gemäss den Ansprüchen 7  
oder 8 einsetzt.
27. Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, hinterlegt  
unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276.
28. Cyanidtolerante Nitrilhydratase, isoliert aus den  
Stämmen der Gattung *Pseudomonas*, hinterlegt unter den  
Nummern DSM 16275 und DSM 16276.

Abbildung 1

MA32

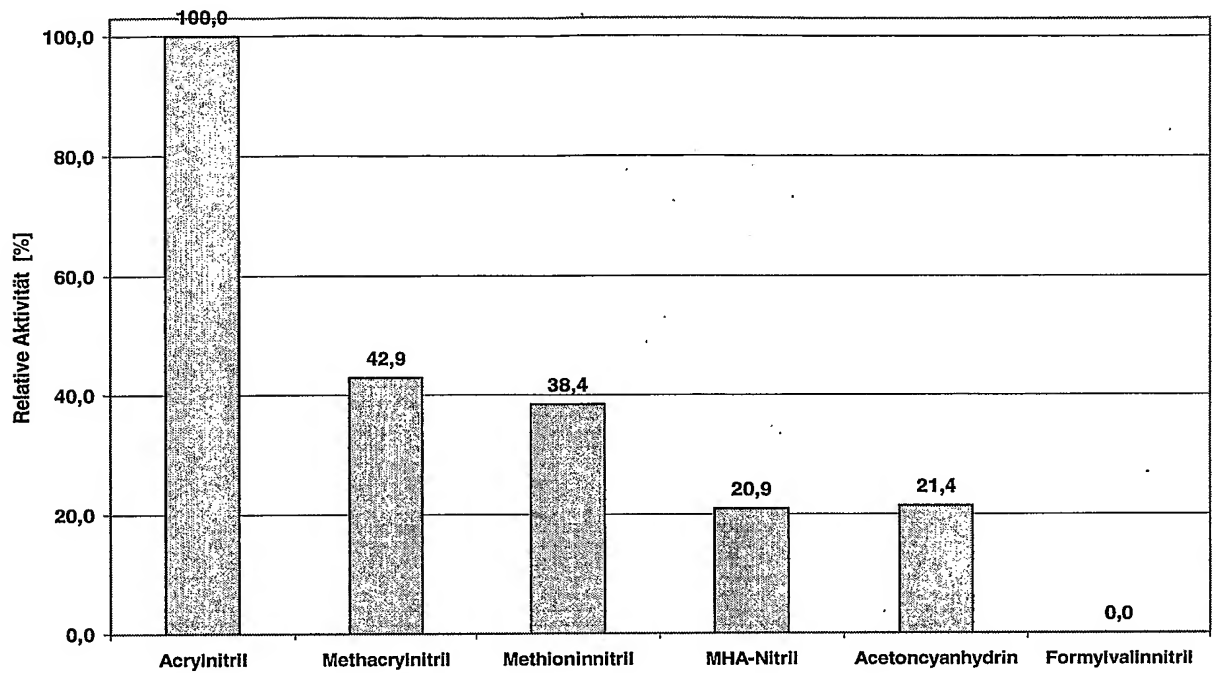


Abbildung 2

MA113

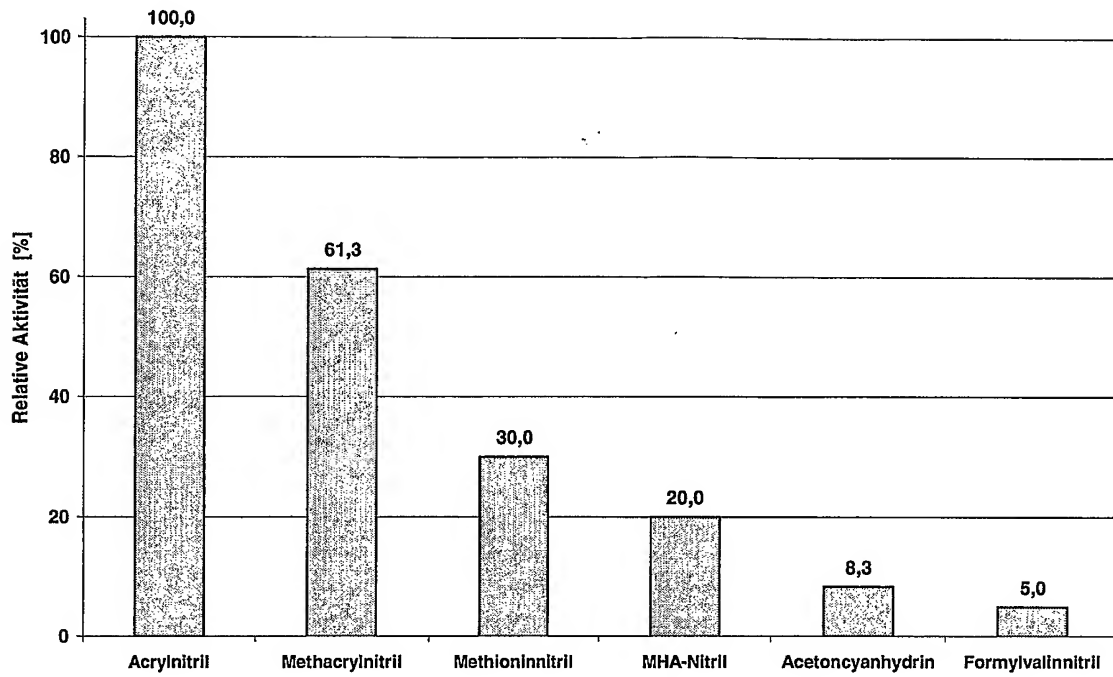


Abbildung 3

MA31

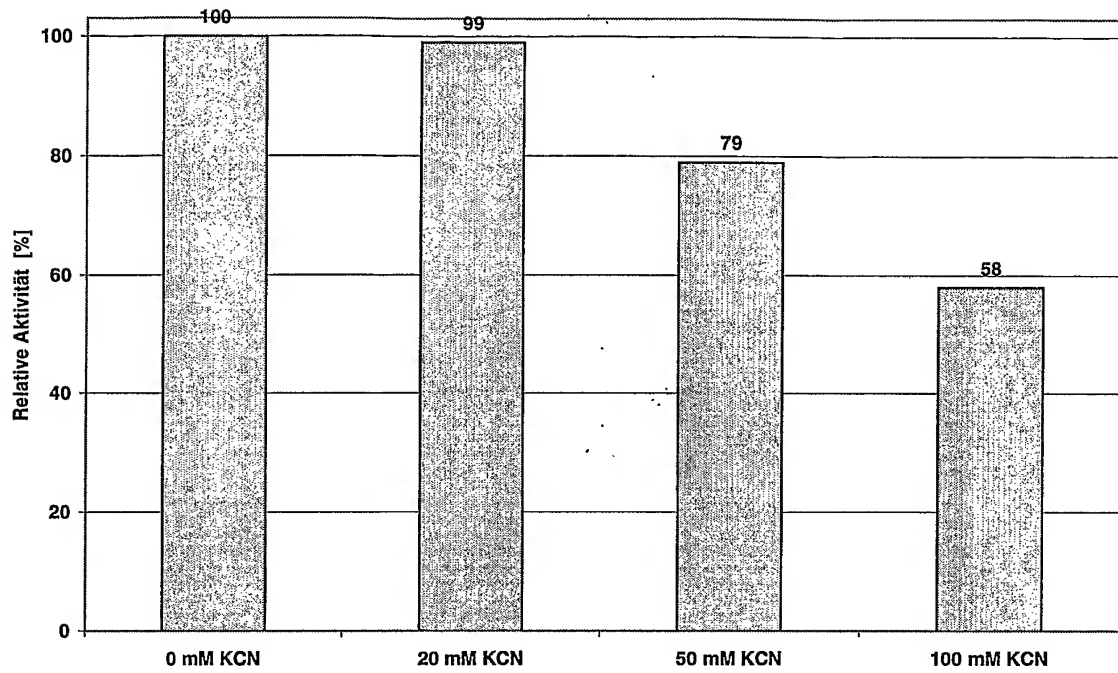




Abbildung 4

MA113

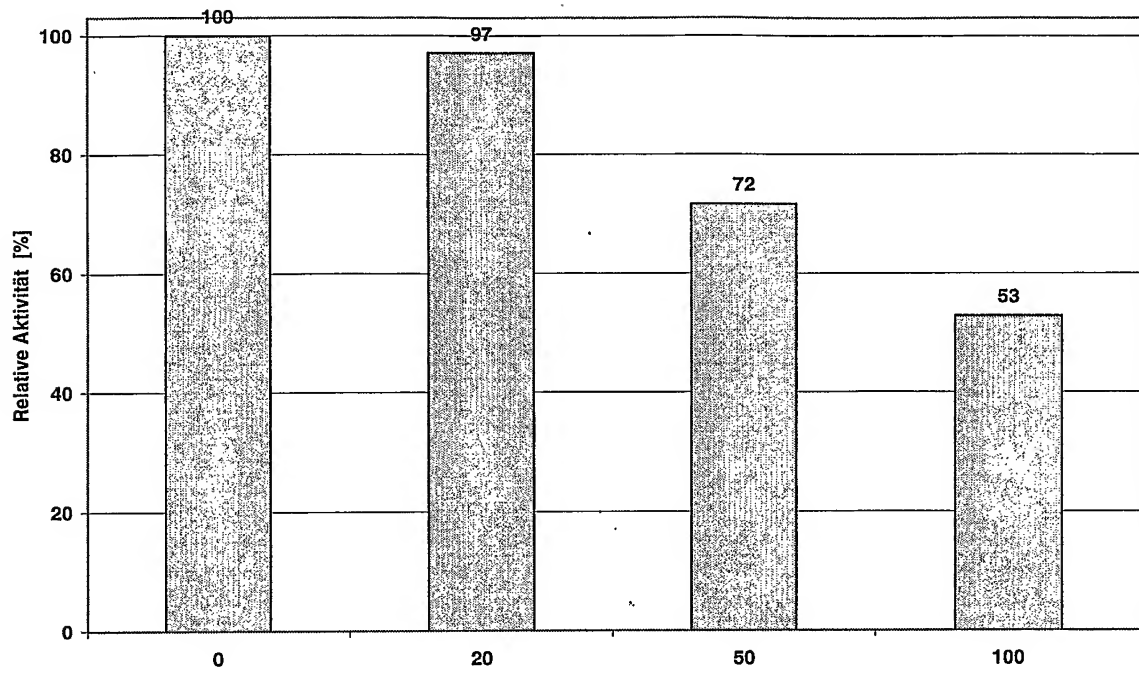


Abbildung 5

MA113

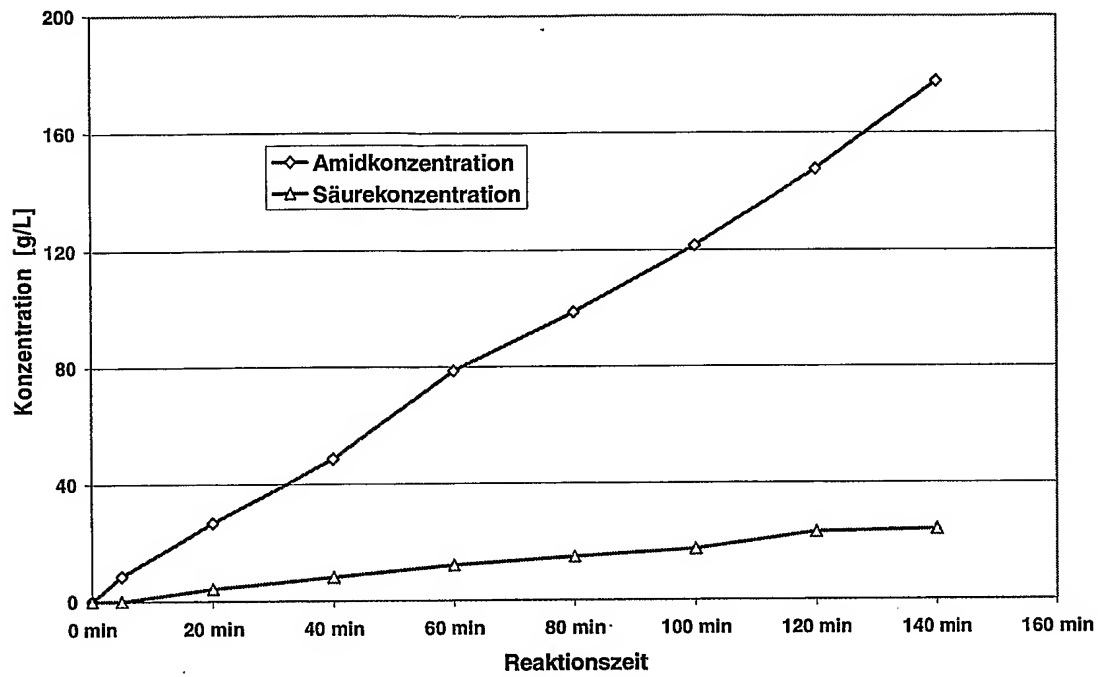


Abbildung 6

MA32

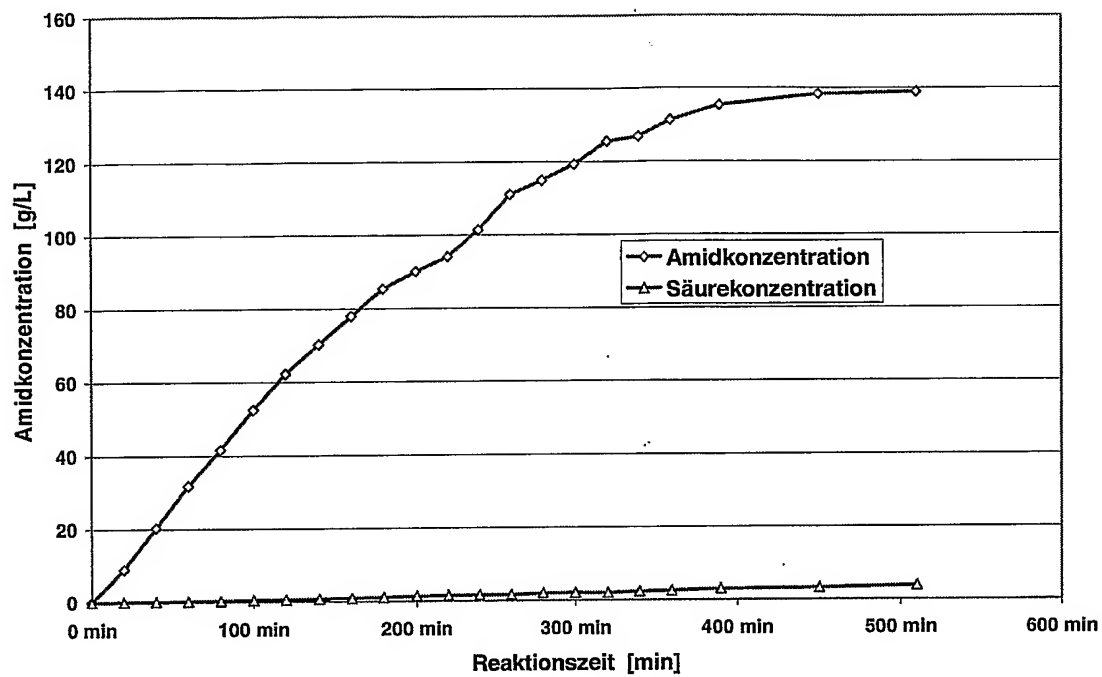
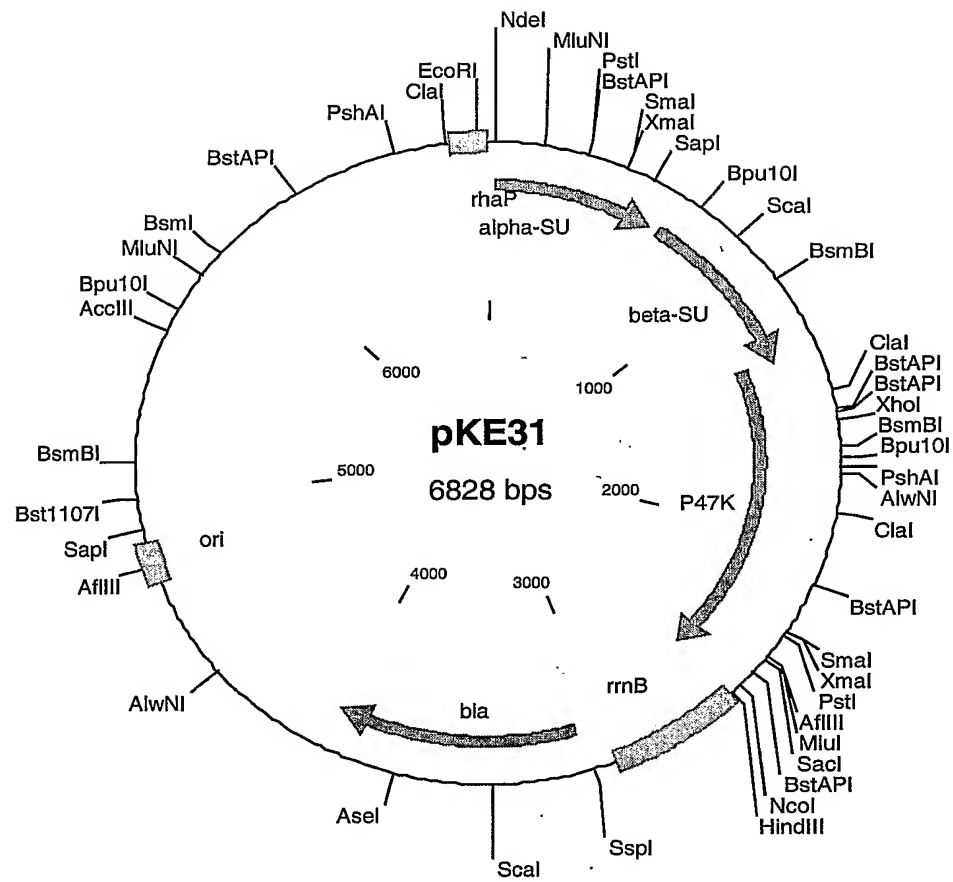


Abbildung 7



## SEQUENCE LISTING

```

5  <110>  Degussa AG
    <120>  Cyanidtolerante Nitrilhydratasen.
    <130>  040061
    <160>  14
10  <170>  PatentIn version 3.3
    <210>  1
    <211>  6828
15  <212>  DNA
    <213>  Pseudomonas marginalis
    <220>
20  <221>  CDS
    <222>  (25)..(609)
    <223>  Gen der Kodierregion der alpha-Untereinheit
    <220>
25  <221>  CDS
    <222>  (650)..(1312)
    <223>  Gen der Kodierregion der beta-Untereinheit
    <220>
30  <221>  gene
    <222>  (1309)..(2577)
    <223>  Gen des Aktivatorproteins
    <400>  1
35  aattcttaag aaggagatat acat atg agt aca gct act tca acg ccc ggc 51
      Met Ser Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly
      1 5
40  gaa aga gcc tgg gca ttg ttt caa gtc ctc aag agc aag gaa ctc atc 99
      Glu Arg Ala Trp Ala Leu Phe Gln Val Leu Lys Ser Lys Glu Leu Ile
      10 15 20 25
    ccg gag ggc tat gtc gag cag ctc acg caa ttg atg gag cac ggc tgg 147
      Pro Glu Gly Tyr Val Glu Gln Leu Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp
      30 35 40
45  agc ccc gag aac ggc gcc cgt gtg gtg gcc aag gcg tgg gtc gat ccg 195
      Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Val Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro
      45 50 55
50  cag ttc cgg gca ctg ttg ctc aag gac ggc acc gcg gcc tgc gcc cag 243
      Gln Phe Arg Ala Leu Leu Leu Lys Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln
      60 65 70
55  ttc ggc tac acc ggc ccc cag ggc gaa tac atc gtt gcc ctg gag gat 291
      Phe Gly Tyr Thr Gly Pro Gln Gly Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp
      75 80 85
60  acg ccg acg ctg aag aac gtg att gtc tgc agc ctg tgc tcc tgc acc 339
      Thr Pro Thr Leu Lys Asn Val Ile Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr
      90 95 100 105

```

	aac tgg ccg gtc ctc ggc ctg cca ccg gag tgg tac aag ggt ttc gag	387
	Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu	
	110 115 120	
5	ttc cgc gca cgc ctg gtc cgg gag ggg cgc acg gta ctg cgc gag ctg	435
	Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu	
	125 130 135	
10	ggg acg gag ttg ccc cgg gac atg gtg gtc aag gtc tgg gac acc agc	483
	Gly Thr Glu Leu Pro Arg Asp Met Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser	
	140 145 150	
15	gcc gaa agc cgc tac ctg gtg ctg ccg gtc agg ccg gaa ggc tca gaa	531
	Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu Pro Val Arg Pro Glu Gly Ser Glu	
	155 160 165	
20	cac atg agc gaa gag cag ctt caa gcg ctg gtg acc aaa gac gtg ctg	579
	His Met Ser Glu Glu Gln Leu Gln Ala Leu Val Thr Lys Asp Val Leu	
	170 175 180 185	
	atc ggc gtc gcc ctg ccc cgc gtg ggc tga gaacaacacc tcatcatcgt	629
	Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val Gly	
	190	
25	tcactcccg agttttgatt atg gat ggc ttt cac gat ctc ggc ggt ttc caa	682
	Met Asp Gly Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln	
	195 200 205	
30	ggc ttt gga aaa gtc cct cac acc atc aac agc ctg agc tac aaa cag	730
	Gly Phe Gly Lys Val Pro His Thr Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln	
	210 215 220	
35	gtg ttc aag cag gac tgg gag cat ctg gcc tac agc ttg atg ttc atc	778
	Val Phe Lys Gln Asp Trp Glu His Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile	
	225 230 235	
40	ggt gcc gac cac ttg aaa aag ttc agc gtg gac gaa gtg cgt cac gcc	826
	Gly Ala Asp His Leu Lys Lys Phe Ser Val Asp Glu Val Arg His Ala	
	240 245 250	
	gtc gaa cgc ctg gat gtg cgc cag cat gtc ggc acc cag tac tac gaa	874
	Val Glu Arg Leu Asp Val Arg Gln His Val Gly Thr Gln Tyr Tyr Glu	
	255 260 265	
45	cgc tac gtc atc gcg acc gcc acc ctg ctg gtc gaa acc ggc gtg atc	922
	Arg Tyr Val Ile Ala Thr Ala Thr Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile	
	270 275 280 285	
50	acc cag gcg gag ctt gat cag gcc ttg ggc tcc cac ttc aag ctg gcg	970
	Thr Gln Ala Glu Leu Asp Gln Ala Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala	
	290 295 300	
55	aat ccc gcc cat gcc gag ggc cgc ccg gcg att acg ggg cgg ccg ccc	1018
	Asn Pro Ala His Ala Glu Gly Arg Pro Ala Ile Thr Gly Arg Pro Pro	
	305 310 315	
	ttc gag gtg ggg gat cgg gtg gtg gtg cga gac gaa tat gtg gct gga	1066
	Phe Glu Val Gly Asp Arg Val Val Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly	
	320 325 330	

	cac atc cgc atg ccc gcc tac gtg cgc ggc aag gaa ggc gtg gtc ctg	1114
	His Ile Arg Met Pro Ala Tyr Val Arg Gly Lys Glu Gly Val Val Leu	
	335 340 345	
5	cac cgc acg tca gag aaa tgg ccg ttc ccc gac gca atc ggg cat ggc	1162
	His Arg Thr Ser Glu Lys Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly	
	350 355 360 365	
10	gat gta agc gca gcc cat caa ccc acc tac cac gtc gag ttc gcc gtg	1210
	Asp Val Ser Ala Ala His Gln Pro Thr Tyr His Val Glu Phe Ala Val	
	370 375 380	
15	aag gac ctg tgg gga gat gcc gcc gat gag ggt ttt gtg gtg gtc gac	1258
	Lys Asp Leu Trp Gly Asp Ala Ala Asp Glu Gly Phe Val Val Val Asp	
	385 390 395	
20	ctg ttc gaa agc tac ctg gac aag gcc gcc ggc gcg cgc gcg gtg aac	1306
	Leu Phe Glu Ser Tyr Leu Asp Lys Ala Ala Gly Ala Arg Ala Val Asn	
	400 405 410	
	cca tga cagacggcgc ccaggcaagc cgactgccgg tgacggctcct ttcgggcttc	1362
	Pro	
25	ctcggcgccg gcaagaccac cctgctcaac cacatcctgc gcaatcgcga aggccctgcgc	1422
	gtggccgtca tcgtcaatga catgagcgaa gtcaatatcg atgccgaaga ggtgcagcgc	1482
30	gatgtcgcgc tgcaccgtgg tcgcgatgag ctgatcgaga tgagcaacgg gtgcatctgc	1542
	tgcaccctgc gcgcgattt gctcgagcag atcagcatgc tcgcacgcca acagcgtttc	1602
	gattacctgc tgattgaatc cacggggatc tccgagccga tgccggtcgc ggagacgttc	1662
35	gccttccttg acgctgatgg cttcagcctc agcgaactgg cgcgcctgga caccttggtg	1722
	acggtggtcg atggcagtcg tttccaggaa ctgctcgaat cgccgcacac cgttgaccag	1782
40	gatgacgcca cgccagacgc acccaagcgc cacctggccg atctgctgat cgaacagggtg	1842
	gagtacgcca acgtcattct cgtcaataag ctggatctga tcgatgcagc gcagtatcag	1902
	gccgtgcagg cgatcctcac aggccctaac ccgacggcgc ggatcatgcc gatggcccac	1962
45	ggtaacatcc catcagccag cctgctcggc acccatctgt ttgatttacc cagcctcgcg	2022
	gcgtcgccgg gctggatgcg gaaaatggag gcggcagacg cgccggcctc cgagtcggac	2082
50	acctatggcg tgacgtcctg ggtgtaccgt gagcgcgcac ctttccaccc gcaacggttg	2142
	ctcgactttc tccagcagcc ctggtgcaac gggcggttgc tgcgcagcaa aggttacttc	2202
	tggcttgcca gccgccacct ggaaaccggc ctgctggtgc aaagcgcaa gcggttccag	2262
55	tgggactatg tcgggcgctg gtggaacttc atcgagccgt cgcaatggcc ccgggacgaa	2322
	taccggctgc agggcatcag ggccaaatgg gacagcgtgg tcggcgactg ccggcaggag	2382
60	ttggtgttta tcggccaggg cctcgacacc gacgcgttac agcgcgagct cgaccactgc	2442
	ctgctgagcg ccaggaaat cgccgcgggc cactggcct ggcaagcgct gccaggggcg	2502

	accgcctttg	accgacagac	ccttgcccg	ccccacaca	gcccattggcg	attgccccca	2562
5	tttgatccga	gatagaagct	tctgttttgg	cggatgagag	aagattttca	gcctgataca	2622
	gattaaatca	gaacgcagaa	gcggtctgat	aaaacagaat	ttgcctggcg	gcagtagcgc	2682
	ggtgggtccca	cctgacccca	tgccgaactc	agaagtgaag	cgccgtagcg	ccgatggtag	2742
10	tgtgggggtct	cccatgcca	gagtagggaa	ctgccaggca	tcaaataaaa	cgaaaggctc	2802
	agtcgaaaga	ctgggccttt	cgttttatct	gttgtttgtc	ggtgaacgct	ctcctgagta	2862
15	ggacaaatcc	gccgggagcg	gatttgaacg	ttgcgaagca	acggcccggg	gggtggcggg	2922
	caggacgccc	gccataaact	gccaggcatc	aaattaagca	gaaggccatc	ctgacggatg	2982
	gcctttttgc	gtttctacaa	actcttttgt	ttatttttct	aaatacattc	aaatatgtat	3042
20	ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	attgaaaaag	gaagagtatg	3102
	agtattcaac	atttccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	cggcattttg	ccttcctggt	3162
25	tttgctcacc	cagaaacgct	ggtgaaagta	aaagatgctg	aagatcagtt	gggtgcacga	3222
	gtgggttaca	tcgaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	ttgagagttt	tcgccccgaa	3282
	gaacgttttc	caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	gtggcgcggt	attatccgt	3342
30	gttgacgccg	ggcaagagca	actcggtcgc	cgcatacact	attctcagaa	tgacttggtt	3402
	gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	tgacagtaag	agaattatgc	3462
35	agtgtgcca	taaccatgag	tgataaact	gcggccaact	tacttctgac	aacgatcgga	3522
	ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	atcatgtaac	tcgccttgat	3582
	cgttgggaac	cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	agcgtgacac	cacgatgcct	3642
40	gtagcaatgg	caacaacggt	gcgcaaaact	ttaactggcg	aactacttac	tctagcttcc	3702
	cggcaacaat	taatagactg	gatggaggcg	gataaagttg	caggaccact	tctgcgctcg	3762
45	gcccttccgg	ctggctgggt	tattgctgat	aatctggag	ccggtgagcg	tgggtctcgc	3822
	ggtatcattg	cagcactggg	gccagatggt	aagccctccc	gtatcgtagt	tatctacacg	3882
	acgggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	tcgctgagat	aggtgcctca	3942
50	ctgattaagc	attggtaact	gtcagaccaa	gtttactcat	atatacttta	gattgattta	4002
	aaacttcatt	tttaatttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	tttttgataa	tctcatgacc	4062
55	aaaatccctt	aacgtgagtt	ttcgttccac	tgagcgtcag	accccgtaga	aaagatcaaa	4122
	ggatcttctt	gagatccttt	ttttctgcgc	gtaatctgct	gcttgcaaac	aaaaaaacca	4182
	ccgctaccag	cgggtggtttg	tttgccggat	caagagctac	caactctttt	tccgaaggta	4242
60	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	actgtccttc	tagtgtagcc	gtagttaggc	4302
	caccacttca	agaactctgt	agcaccgcct	acatacctcg	ctctgctaata	cctgttacca	4362



	gtggctgctg	ccagtggcga	taagtctgtgt	cttaccgggt	tggaactcaag	acgatagtta	4422
5	ccggataagg	cgcagcggtc	gggctgaacg	gggggttctg	gcacacagcc	cagcttggag	4482
	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	tatgagaaag	cgccacgctt	4542
	cccgaaggga	gaaaggcgga	caggtatccg	gtaagcggca	gggtcggaa	aggagagcgc	4602
10	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	gtcctgtcgg	gtttcgccac	4662
	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	ggcggagcct	atggaaaaac	4722
	gccagcaacg	cggccttttt	acggttcctg	gccttttgct	ggccttttgc	tcacatgttc	4782
15	tttcctgcgt	tatcccctga	ttctgtggat	aaccgtatta	ccgcctttga	gtgagctgat	4842
	accgctcgcc	gcagccgaac	gaccgagcgc	agcaggtcag	tgagcgagga	agcggaaagag	4902
20	cgccctgatgc	ggtattttct	ccttacgcac	ctgtgcggta	tttcacaccg	catatatggg	4962
	gcactctcag	tacaatctgc	tctgatgccg	catagttaag	ccagtataca	ctccgctatc	5022
	gctacgtgac	tgggtcatgg	ctgcgccccg	acaccgcgca	acaccgctg	acgcgccctg	5082
25	acgggcttgt	ctgctcccgg	catccgctta	cagacaagct	gtgaccgtct	ccgggagctg	5142
	catgtgtcag	aggtttttcac	cgctcatcacc	gaaacgcgcg	aggcagctgc	ggtaaagctc	5202
30	atcagcgtgg	tcgtgaagcg	attcacagat	gtctgcctgt	tcattccgct	ccagctcggt	5262
	gagtttctcc	agaagcggtta	atgtctggct	tctgataaag	cgggccatgt	taagggcggt	5322
	tttttctctg	ttgggtcactt	gatgcctccg	tgtaaggggg	aatttctgtt	catgggggta	5382
35	atgataccga	tgaacgaga	gaggatgctc	acgatacggg	ttactgatga	tgaacatgcc	5442
	cggttactgg	aacgttgtga	gggtaaacaa	ctggcggtat	ggatgcggcg	ggaccagaga	5502
40	aaaatcactc	aggggtcaatg	ccagcgcctc	gttaatacag	atgtaggtgt	tccacagggg	5562
	agccagcagc	atcctgcgat	gcagatccgg	aacataatgg	tgacgggcgc	tgacttccgc	5622
	gtttccagac	tttacgaaac	acggaaaccg	aagaccattc	atgttggtgc	tcaggtcgca	5682
45	gacgttttgc	agcagcagtc	gcttcacggt	cgctcgcgta	tcgggtgattc	attctgctaa	5742
	ccagtaaggc	aaccccgcca	gcctagccgg	gtcctcaacg	acaggagcac	gatcatgcgc	5802
50	acccgtggcc	aggacccaac	gctgcccag	atgcgcgcgc	tgccggctgct	ggagatggcg	5862
	gacgcgatgg	atatgttctg	ccaagggttg	gtttgcgcac	tcacagttct	ccgcaagaat	5922
	tgattggctc	caattcttgg	agtgggtgaat	cggttagcga	ggtgccgcgc	gcttccattc	5982
55	aggctgaggt	ggcccggctc	catgcaccgc	gacgcaacgc	ggggaggcag	acaaggtata	6042
	ggggggcgcg	cctacaatcc	atgccaaccc	gttccatgtg	ctcgccgagg	cggcataaat	6102
60	cgccgtgacg	atcagcggtc	cagtgatcga	agttaggctg	gtaagagccg	cgagcgatcc	6162
	ttgaagctgt	ccctgatggg	cgctcatctac	ctgcctggac	agcatggcct	gcaacgcggg	6222

catcccgatg cgcgcggaag cgagaagaat cataatgggg aaggccatcc agcctcgcggt 6282  
 5 cgcgaaacgcc agcaagacgt agcccagcgc gtcggccgcc atgccggcga taatggcctg 6342  
 cttctcgccg aaacgtttgg tggcgggacc agtgacgaag gcttgagcga gggcgtgcaa 6402  
 gattccgaat accgcaagcg acaggccgat catcgtcgcg ctccagcgaa agcgggtcctc 6462  
 10 gccgaaaatg acccagagcg ctgccggcac ctgtcctacg agttgcatga taaagaagac 6522  
 agtcataagt gcggcgacga tagtcatgcc ccgcgcccac cggaaggagc tgactggggtt 6582  
 15 gaaggctctc aagggcacgc gtcgacgctc tcccttatgc gactcctgca ttaggaagca 6642  
 gcccagtagt aggttgaggc cgttgagcac cgccgccgca aggaatgggtg catgcatcga 6702  
 tcaccacaat tcagcaaatt gtgaacatca tcacgttcat ctttccctgg ttgccaatgg 6762  
 20 cccattttcc tgtcagtaac gagaaggctcg cgaattcagg cgcttttttag actgggtcgta 6822  
 atgaac 6828  
  
 25 <210> 2  
 <211> 194  
 <212> PRT  
 <213> *Pseudomonas marginalis*  
 30 <400> 2  
 Met Ser Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Trp Ala Leu Phe  
 1 5 10 15  
 35 Gln Val Leu Lys Ser Lys Glu Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Val Glu Gln  
 20 25 30  
 40 Leu Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg  
 35 40 45  
 45 Val Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Ala Leu Leu Leu  
 50 55 60  
 Lys Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Tyr Thr Gly Pro Gln  
 65 70 75 80  
 50 Gly Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp Thr Pro Thr Leu Lys Asn Val  
 85 90 95  
 55 Ile Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu  
 100 105 110  
 60 Pro Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg  
 115 120 125

Glu Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Arg Asp  
 130 135 140  
 5 Met Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val  
 145 150 155 160  
 10 Leu Pro Val Arg Pro Glu Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu  
 165 170 175  
 15 Gln Ala Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg  
 180 185 190  
 Val Gly  
 20  
 <210> 3  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 25 <213> *Pseudomonas marginalis*  
 <400> 3  
 30 Met Asp Gly Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln Gly Phe Gly Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro His Thr Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln Val Phe Lys Gln Asp  
 20 25 30  
 35 Trp Glu His Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile Gly Ala Asp His Leu  
 35 40 45  
 40 Lys Lys Phe Ser Val Asp Glu Val Arg His Ala Val Glu Arg Leu Asp  
 50 55 60  
 45 Val Arg Gln His Val Gly Thr Gln Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Ala  
 65 70 75 80  
 50 Thr Ala Thr Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile Thr Gln Ala Glu Leu  
 85 90 95  
 Asp Gln Ala Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala Asn Pro Ala His Ala  
 100 105 110  
 55 Glu Gly Arg Pro Ala Ile Thr Gly Arg Pro Pro Phe Glu Val Gly Asp  
 115 120 125  
 60 Arg Val Val Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly His Ile Arg Met Pro  
 130 135 140

5	Ala Tyr Val Arg Gly Lys Glu Gly Val Val Leu His Arg Thr Ser Glu 145 150 155 160	
	Lys Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Asp Val Ser Ala Ala 165 170 175	
10	His Gln Pro Thr Tyr His Val Glu Phe Ala Val Lys Asp Leu Trp Gly 180 185 190	
15	Asp Ala Ala Asp Glu Gly Phe Val Val Val Asp Leu Phe Glu Ser Tyr 195 200 205	
20	Leu Asp Lys Ala Ala Gly Ala Arg Ala Val Asn Pro 210 215 220	
	<210> 4 <211> 1269 <212> DNA <213> Pseudomonas marginalis	
	<220> <221> CDS <222> (1)..(1269) <223> Gen der Kodierregion des Aktivatorproteins	
35	<400> 4 atg aca gac ggc gcc cag gca agc cga ctg ccg gtg acg gtc ctt tcg Met Thr Asp Gly Ala Gln Ala Ser Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser 1 5 10 15	48
40	ggc ttc ctc ggc gcc ggc aag acc acc ctg ctc aac cac atc ctg cgc Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg 20 25 30	96
45	aat cgc gaa ggc ctg cgc gtg gcc gtc atc gtc aat gac atg agc gaa Asn Arg Glu Gly Leu Arg Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu 35 40 45	144
	gtc aat atc gat gcc gaa gag gtg cag cgc gat gtc gcg ctg cac cgt Val Asn Ile Asp Ala Glu Glu Val Gln Arg Asp Val Ala Leu His Arg 50 55 60	192
50	ggt cgc gat gag ctg atc gag atg agc aac ggg tgc atc tgc tgc acc Gly Arg Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr 65 70 75 80	240
55	ctg cgc gcc gat ttg ctc gag cag atc agc atg ctc gca cgc caa cag Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Met Leu Ala Arg Gln Gln 85 90 95	288
60	cgt ttc gat tac ctg ctg att gaa tcc acg ggg atc tcc gag ccg atg Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met 100 105 110	336

	ccg gtc gcg gag acg ttc gcc ttc ctt gac gct gat ggc ttc agc ctc	384
	Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asp Gly Phe Ser Leu	
	115 120 125	
5	agc gaa ctg gcg cgc ctg gac acc ttg gtg acg gtg gtc gat ggc agt	432
	Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Gly Ser	
	130 135 140	
10	cgt ttc cag gaa ctg ctc gaa tcg ccg cac acc gtt gac cag gat gac	480
	Arg Phe Gln Glu Leu Leu Glu Ser Pro His Thr Val Asp Gln Asp Asp	
	145 150 155 160	
15	gcc acg cca gac gca ccc aag cgc cac ctg gcc gat ctg ctg atc gaa	528
	Ala Thr Pro Asp Ala Pro Lys Arg His Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu	
	165 170 175	
20	cag gtg gag tac gcc aac gtc att ctc gtc aat aag ctg gat ctg atc	576
	Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Leu Asp Leu Ile	
	180 185 190	
25	gat gca gcg cag tat cag gcc gtg cag gcg atc ctc aca ggc ctt aac	624
	Asp Ala Ala Gln Tyr Gln Ala Val Gln Ala Ile Leu Thr Gly Leu Asn	
	195 200 205	
30	ccg acg gcg cgg atc atg ccg atg gcc cac ggt aac atc cca tca gcc	672
	Pro Thr Ala Arg Ile Met Pro Met Ala His Gly Asn Ile Pro Ser Ala	
	210 215 220	
35	agc ctg ctc ggc acc cat ctg ttt gat tta ccc agc ctc gcg gcg tcg	720
	Ser Leu Leu Gly Thr His Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ser	
	225 230 235 240	
40	ccg ggc tgg atg cgg aaa atg gag gcg gca gac gcg ccg gcc tcc gag	768
	Pro Gly Trp Met Arg Lys Met Glu Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ser Glu	
	245 250 255	
45	tcg gac acc tat ggc gtg acg tcc tgg gtg tac cgt gag cgc gca cct	816
	Ser Asp Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Glu Arg Ala Pro	
	260 265 270	
50	ttc cac ccg caa cgg ttg ctc gac ttt ctc cag cag ccc tgg tgc aac	864
	Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Gln Gln Pro Trp Cys Asn	
	275 280 285	
55	ggg cgg ttg ctg cgc agc aaa ggt tac ttc tgg ctt gcc agc cgc cac	912
	Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His	
	290 295 300	
60	ctg gaa acc ggc ctg ctg gtg caa agc ggc aag cgg ttc cag tgg gac	960
	Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Gln Ser Gly Lys Arg Phe Gln Trp Asp	
	305 310 315 320	
65	tat gtc ggg cgc tgg tgg aac ttc atc gag ccg tcg caa tgg ccc cgg	1008
	Tyr Val Gly Arg Trp Trp Asn Phe Ile Glu Pro Ser Gln Trp Pro Arg	
	325 330 335	
70	gac gaa tac cgg ctg cag ggc atc agg gcc aaa tgg gac agc gtg gtc	1056
	Asp Glu Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Arg Ala Lys Trp Asp Ser Val Val	
	340 345 350	

5           ggc gac tgc cgg cag gag ttg gtg ttt atc ggc cag ggc ctc gac acc   1104  
           Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Val Phe Ile Gly Gln Gly Leu Asp Thr  
                   355                               360                               365

10          gac gcg tta cag cgc gag ctc gac cac tgc ctg ctg agc gcc cag gaa   1152  
           Asp Ala Leu Gln Arg Glu Leu Asp His Cys Leu Leu Ser Ala Gln Glu  
                   370                               375                               380

15          atc gcc gcc gcc cca ctg gcc tgg caa gcg ctg cca ggg gcg acc gcc   1200  
           Ile Ala Ala Gly Pro Leu Ala Trp Gln Ala Leu Pro Gly Ala Thr Ala  
                   385                               390                               395                               400

20          ttt gac cga cag acc ctt gcc cgc ccc cca cac agc cca tgg cga ttg   1248  
           Phe Asp Arg Gln Thr Leu Ala Arg Pro Pro His Ser Pro Trp Arg Leu  
                               405                               410                               415

          ccc cca ttt gat ccg aga tag   1269  
           Pro Pro Phe Asp Pro Arg  
                               420

25          <210> 5  
           <211> 422  
           <212> PRT  
           <213> Pseudomonas marginalis  
           <400> 5

30          Met Thr Asp Gly Ala Gln Ala Ser Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser  
           1                               5                               10                               15

35          Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg  
                   20                               25                               30

40          Asn Arg Glu Gly Leu Arg Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu  
                   35                               40                               45

          Val Asn Ile Asp Ala Glu Glu Val Gln Arg Asp Val Ala Leu His Arg  
                   50                               55                               60

45          Gly Arg Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr  
           65                               70                               75                               80

50          Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Met Leu Ala Arg Gln Gln  
                   85                               90                               95

55          Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met  
                   100                               105                               110

60          Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asp Gly Phe Ser Leu  
                   115                               120                               125

	Ser	Glu	Leu	Ala	Arg	Leu	Asp	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Val	Asp	Gly	Ser	
	130						135					140					
5	Arg	Phe	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Pro	His	Thr	Val	Asp	Gln	Asp	Asp	
	145					150					155					160	
10	Ala	Thr	Pro	Asp	Ala	Pro	Lys	Arg	His	Leu	Ala	Asp	Leu	Leu	Ile	Glu	
					165					170					175		
15	Gln	Val	Glu	Tyr	Ala	Asn	Val	Ile	Leu	Val	Asn	Lys	Leu	Asp	Leu	Ile	
				180					185					190			
20	Asp	Ala	Ala	Gln	Tyr	Gln	Ala	Val	Gln	Ala	Ile	Leu	Thr	Gly	Leu	Asn	
			195					200					205				
25	Pro	Thr	Ala	Arg	Ile	Met	Pro	Met	Ala	His	Gly	Asn	Ile	Pro	Ser	Ala	
	210					215						220					
30	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	His	Leu	Phe	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Ser	
	225					230				235						240	
35	Pro	Gly	Trp	Met	Arg	Lys	Met	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Ser	Glu	
					245					250					255		
40	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Val	Tyr	Arg	Glu	Arg	Ala	Pro	
				260					265					270			
45	Phe	His	Pro	Gln	Arg	Leu	Leu	Asp	Phe	Leu	Gln	Gln	Pro	Trp	Cys	Asn	
			275					280					285				
50	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Ser	Lys	Gly	Tyr	Phe	Trp	Leu	Ala	Ser	Arg	His	
	290						295					300					
55	Leu	Glu	Thr	Gly	Leu	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Lys	Arg	Phe	Gln	Trp	Asp	
	305					310					315					320	
60	Tyr	Val	Gly	Arg	Trp	Trp	Asn	Phe	Ile	Glu	Pro	Ser	Gln	Trp	Pro	Arg	
					325					330					335		
65	Asp	Glu	Tyr	Arg	Leu	Gln	Gly	Ile	Arg	Ala	Lys	Trp	Asp	Ser	Val	Val	
				340					345					350			
70	Gly	Asp	Cys	Arg	Gln	Glu	Leu	Val	Phe	Ile	Gly	Gln	Gly	Leu	Asp	Thr	
			355					360					365				
75	Asp	Ala	Leu	Gln	Arg	Glu	Leu	Asp	His	Cys	Leu	Leu	Ser	Ala	Gln	Glu	
	370						375					380					

Ile Ala Ala Gly Pro Leu Ala Trp Gln Ala Leu Pro Gly Ala Thr Ala  
 385 390 395 400

5 Phe Asp Arg Gln Thr Leu Ala Arg Pro Pro His Ser Pro Trp Arg Leu  
 405 410 415

10 Pro Pro Phe Asp Pro Arg  
 420

15 <210> 6  
 <211> 2371  
 <212> DNA  
 <213> Pseudomonas putida

20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(582)  
 <223> Gen der Kodierregion der alpha-Untereinheit

25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (624)..(1286)  
 <223> Gen der Kodierregion der beta-Untereinheit

30 <220>  
 <221> gene  
 <222> (1283)..(2371)  
 <223> Gen des Aktivatorproteins

35 <400> 6  
 atg acg gca act tca acc cct ggt gag cgg gca cgc gca ttg ttt gca 48  
 Met Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Arg Ala Leu Phe Ala  
 1 5 10 15

40 gtg ctc aag cgc aaa gac ctc atc ccc gag ggc tac atc gaa cag ctc 96  
 Val Leu Lys Arg Lys Asp Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Ile Glu Gln Leu  
 20 25 30

45 acc cag ctg atg gaa cac ggc tgg agc ccg gaa aac ggc gcg cgc atc 144  
 Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Ile  
 35 40 45

50 gtc gcc aag gcc tgg gtc gat ccg cag ttt cgc gag ctg ctg ctc aag 192  
 Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Glu Leu Leu Leu Lys  
 50 55 60

55 gac ggt acg gcc gcc tgc gcc cag ttc ggc ttc acc ggc cca caa ggc 240  
 Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Phe Thr Gly Pro Gln Gly  
 65 70 75 80

55 gaa tac atc gtc gcc ctg gaa gac acc ccg cag ttg aaa aac gtg atc 288  
 Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp Thr Pro Gln Leu Lys Asn Val Ile  
 85 90 95

60 gtc tgt agc ctg tgc tcc tgc acg aac tgg ccg gtg ctg ggc ctg cca 336  
 Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro  
 100 105 110



	cct gag tgg tac aag ggc ttc gag ttc cgt gcg cgg ttg gtc cgg gag	384
	Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu	
	115 120 125	
5	ggg cgc acg gta ttg cgc gag ctg ggc acc gag ttg ccc ggc gac atg	432
	Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Gly Asp Met	
	130 135 140	
10	gtg gtc aag gtc tgg gac acc agc gct gaa agc cgc tac ctg gtg ctg	480
	Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu	
	145 150 155 160	
15	ccg caa cga cca gcg ggc tca gag cat atg agc gaa gag cag ttg cgg	528
	Pro Gln Arg Pro Ala Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu Arg	
	165 170 175	
20	caa ctg gtc acc aag gac gtg ctg atc ggc gtc gcc ctg ccc cgc gtt	576
	Gln Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val	
	180 185 190	
	ggc tga gcaaggccgc ccaaccccat tcaacttccg gagtggttcaa t atg gat ggc	632
	Gly Met Asp Gly	
	195	
25	ttt cac gat ctc ggc ggt ttc cag ggc ttt ggc aaa gtg ccc cac cgc	680
	Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln Gly Phe Gly Lys Val Pro His Arg	
	200 205 210	
30	atc aac agc ctg agc tac aag cag gtg ttc aag cag gac tgg gaa cac	728
	Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln Val Phe Lys Gln Asp Trp Glu His	
	215 220 225	
35	ctg gcc tac agc ctg atg ttc atc ggc gtc gac cac ctg aac aag ttc	776
	Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile Gly Val Asp His Leu Asn Lys Phe	
	230 235 240	
40	agc gtc gac gaa ata cgt cat gcc gtc gaa cgc att gac gtg cgc cag	824
	Ser Val Asp Glu Ile Arg His Ala Val Glu Arg Ile Asp Val Arg Gln	
	245 250 255 260	
	cac gtc ggc acc gaa tac tac gaa cgt tat gtg atc gcc act gcc acg	872
	His Val Gly Thr Glu Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Ala Thr Ala Thr	
	265 270 275	
45	ctg ctg gtc gaa aca ggc gtc atc acc cag gcc gaa ctg gat gaa gca	920
	Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile Thr Gln Ala Glu Leu Asp Glu Ala	
	280 285 290	
50	ctc ggc tcg cac ttc aag ctg gcc aac ccc gcc cat gcg caa ggg cgt	968
	Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala Asn Pro Ala His Ala Gln Gly Arg	
	295 300 305	
55	gct gca att atc ggg cga gcg cct ttt gaa gtg ggc gat cgg gtc atc	1016
	Ala Ala Ile Ile Gly Arg Ala Pro Phe Glu Val Gly Asp Arg Val Ile	
	310 315 320	
60	gta cgc gat gaa tac gtg gcc ggg cat gtg cgc atg cct gca tac gtg	1064
	Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly His Val Arg Met Pro Ala Tyr Val	
	325 330 335 340	

	cgc ggc aag caa ggc gta gtg ctg cac cgg acc act gaa cag tgg ccg	1112
	Arg Gly Lys Gln Gly Val Val Leu His Arg Thr Thr Glu Gln Trp Pro	
	345 350 355	
5	ttt ccg gac gcg att ggc cat ggc gac cag agc gct gcg cat caa ccg	1160
	Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Asp Gln Ser Ala Ala His Gln Pro	
	360 365 370	
10	acc tac cat gtc gag ttc cgc gtg cgg gac ctg tgg ggc gat gcc gca	1208
	Thr Tyr His Val Glu Phe Arg Val Arg Asp Leu Trp Gly Asp Ala Ala	
	375 380 385	
15	gac gac ggc ctg gtg gtg gta gac ctg ttc gaa agc tat ctg gac agg	1256
	Asp Asp Gly Leu Val Val Val Asp Leu Phe Glu Ser Tyr Leu Asp Arg	
	390 395 400	
20	gtc gaa agc ccg cga gtg gtg cgc gca tga gtgccggcgc ccaggcaggc	1306
	Val Glu Ser Pro Arg Val Val Arg Ala	
	405 410	
	cggctgccgg tgacggctcct ttcaggcttc ctccggcgcag gcaagaccac cctgctcaac	1366
	cacatcctgc gcaaccgcca gggcctgaag gtggcgggta tcgtcaatga catgagcgag	1426
25	gtcaacatcg atgccgccca ggtccagcgc gacgttgccg tgtatcgtgg ccaggatgaa	1486
	ttgatagaga tgagcaacgg ctgtatctgc tgcaccctgc gcgccgacct gcttgagcag	1546
	atcagcgcgc tggcgcgcca gcagcgtttc gattacctgt tgatcgagtc caccgggatt	1606
30	tccgagccga tgccagtcgc cgagaccttt gcctttctcg acgccaacgg tttcagcctc	1666
	agcgaactgg cgcggctgga tacgctgggtg acggtgggtcg atgccagcca gttcatggcc	1726
35	atgctcgact ctcccgaac cgtcgcgcgg gccgagctca ccacggatga cagcaggcgc	1786
	ccgctggccg atctgctgat cgagcaggtc gagtatgcca atgtgattct ggtcaacaaa	1846
	cgcgacctgg tcgacgaggc gcagtaccag gccctgcagg cagttctcgc cgggctcaat	1906
40	ccaggcgcac agatcctgcc gatgggtggcc ggcaacgtcg ccctgtcgag cgtccttggt	1966
	accagctgt tcgatttgcc cagccttgcc gcagcgcccg gctggatgaa acagatggac	2026
45	gcgcacgaca ccccggccgg cgagtcgcag acctatggcg tgacgtcatg ggtgtaccga	2086
	gcgcgcgccc cgttccatcc gcaacgcttg cttgattttc tcgcccggcc ctggcgcgac	2146
	ggcgtcttc tgccgagcaa aggttatttc tggcttgcca gccgccaccg cgaaatcggc	2206
50	ttgctggtac acagcggcca gcagtttcaa tgggactatg ttggccattg gtggaacttc	2266
	atcgacacgt cacagtggcc acaggacaag tatcgcttgc agggcatcat ggccaagtgg	2326
55	gacagcatcg tcggcgactg ccgacaggag ctgaaaagct tatga	2371
60	<210> 7	
	<211> 193	
	<212> PRT	
	<213> Pseudomonas putida	

<400> 7  
 Met Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Arg Ala Leu Phe Ala  
 1 5 10 15  
 5 Val Leu Lys Arg Lys Asp Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Ile Glu Gln Leu  
 20 25 30  
 10 Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Ile  
 35 40 45  
 15 Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Glu Leu Leu Leu Lys  
 50 55 60  
 20 Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Phe Thr Gly Pro Gln Gly  
 65 70 75 80  
 Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp Thr Pro Gln Leu Lys Asn Val Ile  
 85 90 95  
 25 Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro  
 100 105 110  
 30 Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu  
 115 120 125  
 35 Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Gly Asp Met  
 130 135 140  
 40 Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu  
 145 150 155 160  
 Pro Gln Arg Pro Ala Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu Arg  
 165 170 175  
 45 Gln Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val  
 180 185 190  
 50 Gly  
 55 <210> 8  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Pseudomonas putida  
 60 <400> 8



```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1089)
<223> Gen der Kodierregion des Aktivatorproteins
5
<400> 9
atg agt gcc ggc gcc cag gca ggc cgg ctg ccg gtg acg gtc ctt tca 48
Met Ser Ala Gly Ala Gln Ala Gly Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser
1 5 10 15
10
ggc ttc ctc ggc gca ggc aag acc acc ctg ctc aac cac atc ctg cgc 96
Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg
20 25 30
15
aac cgc cag ggc ctg aag gtg gcg gtt atc gtc aat gac atg agc gag 144
Asn Arg Gln Gly Leu Lys Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu
35 40 45
20
gtc aac atc gat gcc gcc cag gtc cag cgc gac gtt gcg ctg tat cgt 192
Val Asn Ile Asp Ala Ala Gln Val Gln Arg Asp Val Ala Leu Tyr Arg
50 55 60
25
ggc cag gat gaa ttg ata gag atg agc aac ggc tgt atc tgc tgc acc 240
Gly Gln Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr
65 70 75 80
30
ctg cgc gcc gac ctg ctt gag cag atc agc gcg ctg gcg cgc cag cag 288
Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Ala Leu Ala Arg Gln Gln
85 90 95
35
cgt ttc gat tac ctg ttg atc gag tcc acc ggg att tcc gag ccg atg 336
Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met
100 105 110
40
cca gtc gcc gag acc ttt gcc ttt ctc gac gcc aac ggt ttc agc ctc 384
Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asn Gly Phe Ser Leu
115 120 125
45
agc gaa ctg gcg cgg ctg gat acg ctg gtg acg gtg gtc gat gcc agc 432
Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Ala Ser
130 135 140
50
cag ttc atg gcc atg ctc gac tct ccc gaa acc gtc gcg cgg gcc gac 480
Gln Phe Met Ala Met Leu Asp Ser Pro Glu Thr Val Ala Arg Ala Asp
145 150 155 160
55
gtc acc acg gat gac agc agg cgc ccg ctg gcc gat ctg ctg atc gag 528
Val Thr Thr Asp Asp Ser Arg Arg Pro Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu
165 170 175
60
cag gtc gag tat gcc aat gtg att ctg gtc aac aaa cgc gac ctg gtc 576
Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Arg Asp Leu Val
180 185 190
65
gac gag gcg cag tac cag gcc ctg cag gca gtt ctc gcc ggg ctc aat 624
Asp Glu Ala Gln Tyr Gln Ala Leu Gln Ala Val Leu Ala Gly Leu Asn
195 200 205
70
cca ggc gca cag atc ctg ccg atg gtg gcc ggc aac gtc gcc ctg tcg 672
Pro Gly Ala Gln Ile Leu Pro Met Val Ala Gly Asn Val Ala Leu Ser
210 215 220

```

	agc gtc ctt ggt acc cag ctg ttc gat ttg ccc agc ctt gcc gca gcg	720
	Ser Val Leu Gly Thr Gln Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ala	
	225 230 235 240	
5	ccc ggc tgg atg aaa cag atg gac gcg cac gac acc ccg gcc ggc gag	768
	Pro Gly Trp Met Lys Gln Met Asp Ala His Asp Thr Pro Ala Gly Glu	
	245 250 255	
10	tcg cag acc tat ggc gtg acg tca tgg gtg tac cga gcg cgc gcc ccg	816
	Ser Gln Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Ala Arg Ala Pro	
	260 265 270	
15	ttc cat ccg caa cgc ttg ctt gat ttt ctc gcc cgg ccc tgg cgc gac	864
	Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Ala Arg Pro Trp Arg Asp	
	275 280 285	
20	ggc cgt ctt ctg cgc agc aaa ggt tat ttc tgg ctt gcc agc cgc cac	912
	Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His	
	290 295 300	
25	cgc gaa atc ggc ttg ctg gta cac agc ggc cag cag ttt caa tgg gac	960
	Arg Glu Ile Gly Leu Leu Val His Ser Gly Gln Gln Phe Gln Trp Asp	
	305 310 315 320	
30	tat gtt ggc cat tgg tgg aac ttc atc gac acg tca cag tgg cca cag	1008
	Tyr Val Gly His Trp Trp Asn Phe Ile Asp Thr Ser Gln Trp Pro Gln	
	325 330 335	
35	gac aag tat cgc ttg cag ggc atc atg gcc aag tgg gac agc atc gtc	1056
	Asp Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Met Ala Lys Trp Asp Ser Ile Val	
	340 345 350	
40	ggc gac tgc cga cag gag ctg aaa agc tta tga	1089
	Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Lys Ser Leu	
	355 360	
45	<210> 10	
	<211> 362	
	<212> PRT	
	<213> Pseudomonas putida	
	<400> 10	
50	Met Ser Ala Gly Ala Gln Ala Gly Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser	
	1 5 10 15	
55	Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg	
	20 25 30	
60	Asn Arg Gln Gly Leu Lys Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu	
	35 40 45	
65	Val Asn Ile Asp Ala Ala Gln Val Gln Arg Asp Val Ala Leu Tyr Arg	
	50 55 60	
70	Gly Gln Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr	
	65 70 75 80	

	Leu	Arg	Ala	Asp	Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Ser	Ala	Leu	Ala	Arg	Gln	Gln	
					85					90					95		
5	Arg	Phe	Asp	Tyr	Leu	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr	Gly	Ile	Ser	Glu	Pro	Met	
				100					105					110			
10	Pro	Val	Ala	Glu	Thr	Phe	Ala	Phe	Leu	Asp	Ala	Asn	Gly	Phe	Ser	Leu	
			115					120					125				
15	Ser	Glu	Leu	Ala	Arg	Leu	Asp	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Val	Asp	Ala	Ser	
		130					135					140					
20	Gln	Phe	Met	Ala	Met	Leu	Asp	Ser	Pro	Glu	Thr	Val	Ala	Arg	Ala	Asp	
	145					150					155					160	
25	Val	Thr	Thr	Asp	Asp	Ser	Arg	Arg	Pro	Leu	Ala	Asp	Leu	Leu	Ile	Glu	
					165					170					175		
30	Gln	Val	Glu	Tyr	Ala	Asn	Val	Ile	Leu	Val	Asn	Lys	Arg	Asp	Leu	Val	
				180					185					190			
35	Asp	Glu	Ala	Gln	Tyr	Gln	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Asn	
			195					200					205				
40	Pro	Gly	Ala	Gln	Ile	Leu	Pro	Met	Val	Ala	Gly	Asn	Val	Ala	Leu	Ser	
		210					215					220					
45	Ser	Val	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Ala	
	225					230					235					240	
50	Pro	Gly	Trp	Met	Lys	Gln	Met	Asp	Ala	His	Asp	Thr	Pro	Ala	Gly	Glu	
					245					250					255		
55	Ser	Gln	Thr	Tyr	Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Val	Tyr	Arg	Ala	Arg	Ala	Pro	
				260					265					270			
60	Phe	His	Pro	Gln	Arg	Leu	Leu	Asp	Phe	Leu	Ala	Arg	Pro	Trp	Arg	Asp	
			275					280					285				
65	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Ser	Lys	Gly	Tyr	Phe	Trp	Leu	Ala	Ser	Arg	His	
		290					295					300					
70	Arg	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Val	His	Ser	Gly	Gln	Gln	Phe	Gln	Trp	Asp	
	305					310					315					320	
75	Tyr	Val	Gly	His	Trp	Trp	Asn	Phe	Ile	Asp	Thr	Ser	Gln	Trp	Pro	Gln	
					325					330					335		

Asp Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Met Ala Lys Trp Asp Ser Ile Val  
 340 345 350

5 Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Lys Ser Leu  
 355 360

10 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

15 <220>  
 <223> Primer 1F

<400> 11  
 ctccaccata tgagtacagc tacttcaacg 30

20 <210> 12  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

25 <220>  
 <223> Primer 1R

30 <400> 12  
 cttcataagc ttctatctcg gatcaaattg 30

35 <210> 13  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

40 <220>  
 <223> Primer 2F

<400> 13  
 atgacggcaa cttcaacccc tgggtg 25

45 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

50 <220>  
 <223> Primer 2R

<400> 14  
 tcagctcctg tcggcagtcg 20

55